

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Biophysique

Ecole doctorale Interdisciplinaire pour le vivant (iViv / ED387)

Présentée par

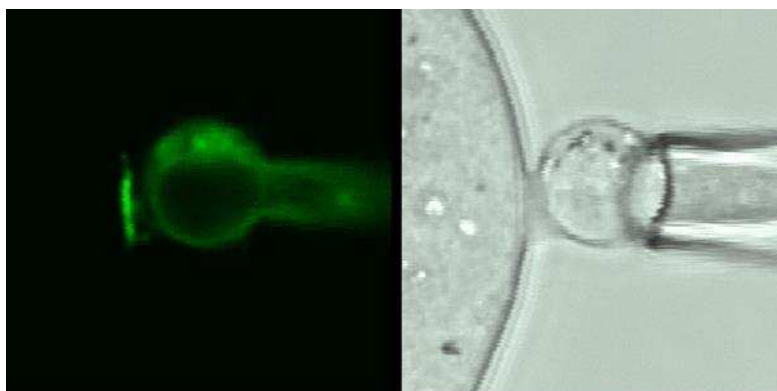
Melle Mariem Chalbi

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Rôle de la protéine spermatique Izumo1 dans l'interaction gamétique chez le
murin**

Soutenue le 24/09/2013



Devant le jury composé de :

Dr. Christine GOURIER Directeur de thèse
Pr. Mariano OSTUNI Rapporteur
Dr. Annie VIALLAT Rapporteur
Pr. Sophie CRIBIER Examineur
Pr. Jean-Philippe WOLF Examineur

Pour la réalisation de ce travail, il a fallu la conjugaison d'efforts multiples, la participation, le soutien de nombreuses personnes que je remercie et à qui j'exprime ma profonde gratitude.

Je voudrais, en premier lieu, remercier de tout mon cœur les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : les Professeurs Sophie Cribier, Jean Philippe Wolf, Mariano Ostuni et Annie Viallat. Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de lire mon mémoire de thèse et me faire bénéficier de leurs critiques et de leurs conseils.

Je ne saurais oublier de remercier encore Monsieur le Professeur Jean-Philippe Wolf pour sa proposition de post-doc ni Monsieur le Professeur Mariano Ostuni avec qui j'ai appris beaucoup grâce à ses explications claires lors des longues séances d'entretien qu'il a bien voulu m'accorder.

Je suis également très reconnaissante envers toute l'équipe des « surface moléculaires organisées » de l'Ecole Normale Supérieure et en particuliers à mes maîtres, Christine Gourier et Frédéric Pincet qui m'ont prise sous leur direction scientifique responsable. Ils avaient déjà guidé mes premiers pas lors de la préparation de mon Master et poursuivi leur attention durant mes trois années de préparation de thèse.

Christine, Fred...j'ai beaucoup appris auprès de vous deux et ma pensée, soyez en assurés, vous évoquera toujours avec une grande cordialité et un profond respect, vous qui êtes deux scientifiques hautement qualifiés, complémentaires aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Christine, comment saurais-je oublier nos longues discussions dans le bureau, nos moments de stress intense au deuxième sous-sol de l'ENS, ces journées qui commencent par « tu as des ovos ? ». Tout cela me manquera sans nul doute.

Fred, vous avez été toujours là pour la réflexion au fil des séances, toujours avec le sourire, rien n'est jamais « grave », même dans les moments où cette recherche, par manque de résultats encourageants, devenait un calvaire d'angoisses et d'incertitudes.

J'adresse mes remerciements sincères à Monsieur le Professeur Eric Perez ainsi qu'à Monsieur le Professeur Wladimir Urbach pour leur disponibilité à mon égard, leurs conseils, et leur bienveillance. Leurs qualités humaines ont su faire régner, à côté de la rigueur des discussions scientifiques, un esprit de grande famille où toutes les occasions pour se retrouver ensemble étaient saisies, comme ces déjeuners où l'on apprenait tout sur tout, allant de la politique internationale aux fruits exotiques chinois, aux différents millésimes de thé... Merci à mon « équipe 5 » et assimilés : Nicolas, Jérôme, Eric, Gamal, Jim, Isabelle, Claire, Vladimir junior, Kevin, Pierre et Andrea et un merci particulier à Benjamin (tu piques ou je pique ?) Merci Ben pour ta gentillesse et ta disponibilité. Nous avons partagé certes des moments de découragement mais nous avons aussi tout fêté ! J'ai goûté la buche de Noël canadienne, le foie gras maison, les gâteaux chinois, je n'oublierai pas les crêpes de Jérôme et le tiramisu de Nicolas, j'ai eu à tourner un film, j'ai appris le troc des capsules de café et des gâteaux.

Je voudrais également témoigner ma gratitude envers Ahmed Ziyat qui m'a appris avec patience tous les mystères de la physiologie des souris, à Bertrand Ducos qui m'a instruite sur les secrets de la plateforme de Biologie ainsi qu'à Virginie Barraud-Lange qui m'a remis le flambeau « Izumo ».

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Claude Boucheix qui m'a tellement appris et conseillé avec lequel j'ai eu, au cours de la préparation de cette thèse, souvent l'occasion de travailler au sein de son équipe. A Monsieur le Professeur Eric Rubinstein pour ses conseils toujours judicieux. Merci Claude, Eric, Arnaud, Martine, Joelle et au reste de l'équipe ; j'ai toujours été reçue avec le sourire et un bon café.

Merci aussi à Xavier Morin, pour sa disponibilité, son aide, ses conseils précieux, nos longues discussions.

Je ne saurais oublier de remercier le trio redoutable, les trois dames de fer, Marie Geofflot, Nora Sadaoui et Annie Ribaudeau, qui ont été toujours là pour les fax passés à l'envers, les commandes passées après 18h, mais aussi pour réceptionner les souris égarées à huit heures du matin en département de physique.

Merci aussi à Zaïre qui a toujours, avec son amabilité légendaire, été disponible et efficace même pour ressusciter un clavier d'ordinateur noyé au café. Merci à José et au service mécanique. Merci à Didier et son équipe toujours prêts à dépanner et à déménager les objets les plus improbables....Merci à Christophe Auger pour son écoute, ses conseils, sa disponibilité et sa grande gentillesse. Merci à toute l'équipe de l'animalerie centrale : Guillaume, Amandine, Lucia... qui prennent autant soin des souris que des chercheurs.

Je remercie aussi toute l'équipe de la salle de Culture de l'IBENS, Ollivier Collin et sa rigueur, Maité et sa disponibilité, Lydia et sa gentillesse, Nathalie et Adrien toujours prêts à partager les cellules et les moments de détente.

Mes remerciements vont aussi à mes amis proches, ceux qui m'ont soutenue et ont toujours été là, dans le désordre et j'en oublie certainement : Hager, Myriam, Guillaume, Marius, Melissa, Chedly, Alya, Lorenzo, Lina, Mouna, Mélissa, Bouty, Saad, Bassem, Boo, Jed, Asma, Ahlem, Sandrine, Daniel, Pf, Maher, Hatem, Neil, Mouna, Michel, Dali, Olfa, Azza, Chiraz, Myriam, Ross, Hishem, Mourad, Fabrice, Florent et les autres.... Pas au niveau d'une thèse !!!!

Merci aussi à ma famille, et un merci particulier à mes parents, pour avoir toujours cru en moi, pour avoir été d'un soutien à toute épreuve, toujours présents.

Table des Matières

Résumé	10
Introduction	12
1ère partie: Introduction à l'interaction gamétique	18
Chapitre 1 / Les gamètes et la fécondation	19
1. <i>Le gamète femelle : l'ovocyte II</i>	19
2. <i>Le gamète mâle : le spermatozoïde</i>	21
a. La capacitation	24
b. La réaction acrosomique	24
Chapitre 2 / L'adhésion et la fusion dans l'interaction gamétique et les acteurs moléculaires	27
1. <i>L'adhésion et la fusion cellulaire</i>	27
a. L'adhésion cellulaire	27
b. La fusion cellulaire	28
2. <i>Les acteurs protéiques impliqués dans l'interaction gamétique</i>	30
a. Les acteurs ovocytaires	30
i. Les tétraspanines : CD9 et CD81	30
ii. Les Intégrines	33
iii. Les Ancres membranaires : GPI-anchored proteins	34
b. Les acteurs spermatiques	35
i. La protéine Izumo1	35
ii. Les ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease)	35
iii. SPESP1 (Sperm Equatorial Segment Protein)	37
Chapitre 3 / La protéine spermatique Izumo1	38
1. <i>Izumo1 est une protéine clé de la fécondation</i>	38
2. <i>Propriétés structurales d'Izumo1</i>	40
a. Izumo1 : un membre de la superfamille des immunoglobulines (IgSF)	40
b. Ce que l'on sait de la structure d'Izumo1	40
c. La famille Izumo	41
d. La formation de ponts covalents : le pont disulfure	42
e. La glycosylation	42
f. La phosphorylation	43
g. La formation de complexes Izumo	45
h. Interaction avec les autres protéines	46
3. <i>Izumo1 est une protéine spécifique de la tête du spermatozoïde ayant des propriétés de relocalisation et de diffusion</i>	46
a. Izumo1 est une protéine de la tête spermatique	46
b. Izumo1 est une protéine qui se relocalise au moment de la réaction acrosomique	46
c. Izumo1 est une protéine qui se relocalise vers l'ovocyte ?	48
d. Izumo1 une protéine de fusion ?	48

4. Conclusion	49
5. Schéma récapitulatif des principaux acteurs protéiques (Figure 19)	50
Questions posées et objectifs	52
2ème Partie/ matériels et méthodes	54
Chapitre 1/ La préparation des gamètes	55
1. Les lignées de souris	55
a. La lignée « sauvage »	55
b. Les lignées transgéniques : le génotypage, la décontamination, le transfert et la réactivation de lignées	55
i. La lignée CD9 KO	56
ii. La lignée Acr-EGFP	56
iii. La lignée CD9-EGFP	57
2. Le conditionnement des gamètes	57
a. Obtention des ovocytes dépellucidés	58
b. Obtention des spermatozoïdes	58
c. Les fécondations in-vitro (FIV) de contrôle	59
Chapitre 2/ Les cellules eucaryotes	61
1. Les lignées cellulaires utilisées	61
a. La lignée cellulaire K562 : lignée en suspension	61
b. La lignée cellulaire MDA : lignée adhérente	61
c. La lignée cellulaire U2OS : lignée adhérente	61
2. Culture, transfection et manipulation de cellules eucaryotes	62
Chapitre 3/ Les réactifs pour les expériences	63
1. Les anticorps utilisés	63
2. Le marquage des ovocytes	63
3. L'agent de transfection	63
4. La séquence et les plasmides receveurs	64
a. La séquence Izumo1 sauvage murin	64
b. Le plasmide pCAGGS-RFP (X-301 /pCAGGS-IRES2-tagRFP) : vecteur d'expression	64
c. Le plasmide pEGFP-N1 : vecteur d'expression	64
5. Les réactifs de clonage et les systèmes de purification	64
6. Les milieux	65
Chapitre 4 / La micromanipulation par micropipettes	66
1. Les micropipettes	66
2. La fabrication des micropipettes	67
3. Le dispositif expérimental	68

3ème Partie / l'approche cellulaire	70
Chapitre 1 / La mise au point du modèle d'étude	72
1. <i>La recherche de la lignée candidat</i>	72
2. <i>La construction des plasmides</i>	73
a. Le vecteur pCAGGS-Izumo1-RFP	73
b. Le vecteur plzumo1-EGFP	75
3. <i>Validité du modèle</i>	76
a. La validation du protocole d'Immuno-marquage	76
b. L'absence de la protéine native	77
c. Vérification de l'expression des protéines exogènes	77
i. L'expression d'Izumo1 exogène par le vecteur pCAGGS-Izumo1-RFP	77
ii. L'expression d'Izumo1-EGFP par le vecteur plzumo1-EGFP	78
d. La quantification Cellule/ spermatozoïdes par imagerie confocale	79
Chapitre 2 / La technique de mesure de force par micromanipulation de cellules ou Dual Pipette Assay (DPA)	81
1. <i>Le principe de la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules</i>	81
2. <i>Le système expérimental</i>	83
Chapitre 3 / Résultats de l'approche cellulaire	84
1. <i>Izumo1 induit une adhésion spontanée avec l'ovocyte</i>	84
2. <i>Etude de l'adhésion induite par Izumo1 par la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale</i>	85
a. Izumo1 induit une adhésion forte avec recrutement au niveau de la zone de contact	85
b. Cinétique de recrutement et cinétique de fluorescence	89
3. <i>L'adhésion observée est indépendante du modèle cellulaire</i>	91
Conclusion et discussion des résultats obtenus par l'approche cellulaire	92
4ème Partie / L'approche moléculaire par la protéine recombinante	94
Chapitre 1 / Le domaine extracellulaire d'Izumo1	95
1. <i>Conception de la protéine recombinante</i>	95
a. Production	96
b. Purification	96
c. Biotinylation	97
2. <i>Fonctionnalisation des billes de verre</i>	98
a. La fonctionnalisation des billes	100
b. Révélation de la protéine recombinante et analyse par cytométrie de flux	100
Chapitre 2 / Le Biomembrane Force Probe	103
1. <i>Le Principe</i>	103
2. <i>Le dispositif expérimental</i>	104

Chapitre 3 / Résultats de l'approche moléculaire	107
1. <i>Incubation et immunofluorescence</i>	107
2. <i>Caractérisation du lien avec le BFP</i>	108
Conclusion et perspectives sur l'approche moléculaire	110
5ème partie / Les partenaires d'Izumo1 en intra et extracellulaire	112
Chapitre 1/ Interactions par le domaine extracellulaire : le partenaire d'Izumo1 sur l'ovocyte est-il la tétraspanine CD9 ou une protéine partenaire membranaire de CD9 ?	113
1. <i>La tétraspanine CD9 est-elle la molécule partenaire d'Izumo1 ?</i>	113
2. <i>Le partenaire d'Izumo1 est-il une protéine partenaire de CD9 ?</i>	114
a. <i>La tétraspanine CD81 ?</i>	114
b. <i>Le partenaire est-il une autre protéine partenaire de la tétraspanine CD9 ?</i>	116
3. <i>Conclusion</i>	117
Chapitre 2/ Interactions par le domaine cytosolique : Izumo1 est-elle liée au cytosquelette?	118
1. <i>Expériences d'inhibition de la polymérisation de l'actine</i>	118
2. <i>Expériences de marquage fluorescent de l'actine</i>	118
3. <i>Conclusion</i>	120
6ème partie / Izumo1 impliquée au-delà de l'adhésion?	122
Chapitre 1/ Izumo1 induit-elle une fusion ou héli-fusion des membranes cellulaires ?	123
1. <i>Les expériences d'adhésion ovocytes-cellules K562-Izumo1-RFP</i>	123
2. <i>Les expériences d'adhésion ovocytes marqués au Hoechst-cellules K562-Izumo1-RFP</i>	123
3. <i>Les expériences d'adhésion ovocytes PKH-cellules K562-Izumo1-RFP</i>	124
4. <i>Conclusion</i>	125
Chapitre 2/ Un échange de membrane ou « trogocytose » ?	126
Chapitre 3/ Le spermatozoïde est-il internalisé par un phénomène proche de la phagocytose ?	128
Conclusions et perspectives	130
Annexes	134
1. <i>La Séquence Izumo1 Murin</i>	136
2. <i>Les vecteurs</i>	137
3. <i>Protocole de transfection transitoire</i>	140

4.	<i>Protocoles de génotypage pour les différentes lignées de souris</i>	141
5.	<i>Protocole de mutagénèse et clonage</i>	145
6.	<i>Fonctionnalisation de la surface des billes de verre et des globules rouges pour le Biomembrane Force Probe</i>	149

Résumé

Les étapes d'adhésion et de fusion entre l'ovocyte et le spermatozoïde sont des étapes cruciales dans le processus de fécondation. Cependant, de nombreuses questions sont posées aujourd'hui à propos des processus moléculaires qui sous-tendent la réussite de ces étapes. Ces dernières années, un nombre important de molécules clés ont été identifiées comme ayant un rôle majeur dans l'interaction gamétique. A ce jour, la seule protéine membranaire connue dont l'absence cause un échec total de la fécondation est la protéine spermatique Izumo1.

Izumo1 est une protéine transmembranaire, membre de la famille des protéines Izumo et de la superfamille des Immunoglobulines. Malgré son rôle clé dans l'interaction gamétique, ses propriétés fonctionnelles en tant que protéine d'adhésion, de fusion ou ayant la capacité d'organiser des réseaux comprenant des protéines de fusion n'est pas encore élucidé.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés au rôle d'Izumo1 dans l'interaction gamétique.

Pour cela, nous avons généré deux variantes exogènes de la protéine Izumo1 et les avons surexprimées à la membrane de plusieurs lignées cellulaires. L'interaction entre ces cellules exprimant la protéine et l'ovocyte a été analysée au moyen d'une technique de micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale. Nous avons ainsi mis en évidence une forte adhésion entre les cellules exprimant Izumo1 et les ovocytes et nous avons quantifié sa cinétique. Nous avons également généré le domaine extracellulaire recombinant afin de déterminer si Izumo1 seule était capable de se lier directement à l'ovocyte et comment. Nous avons sondé au moyen d'une technique fine de mesure de forces, le biomembrane force probe, l'interaction entre un Izumo1 unique et l'ovocyte. Ces expériences permettent de confirmer que c'est bien Izumo1 et non un partenaire qui est responsable de la forte adhésion entre cellules et ovocytes. Par observation en microscopie confocale d'un ovocyte interagissant avec des cellules surexprimant Izumo1-GFP, nous avons observé l'accumulation d'Izumo1-GFP dans la zone d'adhésion. Le fait que ce processus se reproduise lorsque plusieurs cellules adhèrent à l'ovocyte suggère qu'Izumo1 possède une molécule partenaire largement exprimée à la membrane de l'ovocyte avec laquelle il interagit pour créer de l'adhésion.

Introduction

« And you thought you knew all there was to know about fertilization... »

(Shur et al. 2004)

L'infertilité est un problème majeur en santé publique car un nombre important et sans cesse croissant de couples y sont confrontés (environ 80 millions dans le monde (Harper et al. 2008)); elle constitue un coût en soins important. L'infertilité est définie comme « l'impossibilité de concevoir après 12 mois de rapports sexuels non protégés, ou l'impossibilité de mener une grossesse à terme », selon l'OMS. Le terme stérilité implique un processus définitif, et doit donc être réservé aux cas non curables d'infertilité. Dans 55% des cas, l'infertilité est de cause féminine, dans 35% des cas elle d'origine masculine (Harper et al. 2008), dans 25% des cas les causes sont retrouvées chez les deux partenaires, les 10% de cas restants sont d'origine inexpliquée. Depuis Le premier « bébé éprouvette » bien du chemin a été fait. L'assistance médicale à la procréation (AMP) comprenant l'hyperstimulation ovarienne, la fécondation in-vitro, l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (intracytoplasmic sperm injection, *ICSI*) et la cryoconservation, a permis à 4 millions d'enfants de naître. Mais l'AMP connaît de nombreux échecs. La détresse psychologique engendrée par cette infertilité et par le vécu des traitements itératifs et contraignants qu'elle implique est souvent extrêmement sévère et les coûts sociétaux importants.

Dans sa définition biologique, l'infertilité est l'échec du processus de fécondation. La fécondation chez les mammifères met en jeu un couple unique de cellules hétérotypiques : l'ovocyte, gamète femelle et le spermatozoïde, gamète mâle. Ces deux cellules doivent se trouver, se reconnaître spécifiquement, adhérer l'une à l'autre et fusionner. Ces deux dernières étapes de la fécondation sont souvent regroupées sous le terme générique d'interaction gamétique. Bien que déterminants dans le processus de fécondation, les mécanismes moléculaires et membranaires qui sous-tendent l'interaction des gamètes restent à élucider.

Au cours des vingt dernières années, différentes techniques de biologie ont permis d'identifier un certain nombre d'acteurs moléculaires potentiels intervenant dans le processus de fécondation. Plus récemment, la génération de lignées de souris génétiquement modifiées a permis de confirmer l'implication de plusieurs familles de protéines dans le processus de fusion. Cependant, à l'exception de la tétraspanine CD9 (Kaji et al. 2000; Le Naour et al. 2000; Miyado 2000), à la membrane de l'ovocyte, et de la protéine Izumo1 découverte en 2005 seulement à la surface du spermatozoïde (Inoue et al. 2005), les autres protéines membranaires identifiées ne semblent pas être indispensables à la fusion (He et al. 2003; Rubinstein, Ziyat, Wolf, et al. 2006). Privées d'Izumo1 et/ou de CD9, les gamètes ne sont pas capables de fusionner. Si le mode d'action de CD9 a fait l'objet de nombreuses études et tend à être de mieux en mieux connu, celui d'Izumo1 en revanche n'est pas du tout élucidé. Izumo1 est une protéine de la super famille des immunoglobulines. L'équipe japonaise qui l'a découverte, constatant son rôle incontournable dans le processus de fécondation, lui a donné le nom du Temple de la Fertilité « Izumo ». Son implication et mode d'action en tant que

molécule d'adhésion, de fusion, ou encore comme organisateur membranaire d'autres molécules restent à déterminer et caractériser.

Mon travail de thèse a consisté à combiner des approches de biologie classiques (biologie moléculaire, mutagénèse, fécondation in vitro) à des approches biophysiques de micromanipulation et de microscopie confocale pour contribuer à caractériser l'action d'Izumo1 dans l'interaction gamétique. Pour déterminer l'action spécifique de cette protéine, nous avons mis au point 2 systèmes expérimentaux permettant d'étudier l'interaction d'Izumo1 avec l'ovocyte, le premier à l'échelle de la molécule unique, le second, à l'échelle de la cellule.

Ce manuscrit sera divisé en 6 parties elles-mêmes subdivisées en courts chapitres.

Dans la première partie, nous décrirons les principes de la fécondation, utiles à la compréhension de notre travail. Nous présenterons dans un premier chapitre les gamètes femelle et mâle ainsi que les étapes de la fécondation auxquelles nous nous intéressons : l'adhésion et la fusion. Un second chapitre fera le point sur les différents acteurs protéiques de l'interaction gamétique à l'exception d'Izumo1 auquel nous consacrerons le chapitre 3.

La deuxième partie décrira les matériels et méthodes de notre étude. Le chapitre 1 sera consacré à la description des lignées de souris, le chapitre 2 à celle des lignées de cellules nécessaires au travail. Le chapitre 3 présentera les techniques de biologie moléculaire utilisées et le chapitre 4 décrira les outils biophysiques de micromanipulation grâce auxquels les résultats ont été obtenus.

La troisième partie sera consacrée à l'approche cellulaire que nous avons adoptée pour analyser le rôle d'Izumo1 à l'échelle de la cellule. Le premier chapitre de cette partie exposera la mise au point du modèle d'étude : la recherche de la lignée cellulaire, le clonage des vecteurs d'expression pour la protéine exogène et la validation du modèle. Le deuxième chapitre décrira la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale. Les résultats obtenus et leur discussion feront l'objet du dernier chapitre.

La quatrième partie exposera l'analyse de l'interaction d'Izumo1 avec l'ovocyte à l'échelle de la molécule unique. Nous décrirons dans le premier chapitre la mise au point et la validation de la protéine recombinante ECD-Iz1 qui nous a servi de modèle d'étude. La technique du Biomembrane Force Probe (BFP) fera l'objet du second chapitre de cette partie. Les résultats obtenus seront exposés et discutés dans le troisième chapitre.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux interactions développées par Izumo1 en intra et extracellulaire. Les résultats obtenus seront décrits dans la cinquième partie. Le premier chapitre portera sur l'analyse des interactions développées par le domaine extracellulaire que nous avons pu mettre en évidence ou réfuter. Le second portera sur l'étude d'une possible interaction avec le cytosquelette.

La sixième partie explorera le rôle joué par Izumo1 au-delà de l'étape d'adhésion. Les spermatozoïdes délétés de cette protéine adhèrent à l'ovocyte mais ne fusionnent pas. De ce fait Izumo1 est considérée comme jouant un rôle dans la fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte, nous décrirons dans le premier chapitre les résultats obtenus quant au rôle d'Izumo1 en tant que protéine de fusion. Nos observations nous ont également permis de mettre en évidence des échanges membranaires entre l'ovocyte et le modèle cellulaire rappelant le phénomène de trogocytose et un phénomène d'internalisation de la cellule portant la protéine exogène proche de la phagocytose. Les résultats de ces observations sont décrits dans les chapitre deux et trois respectivement.

Enfin en guise de conclusion, après un bref rappel des différents résultats obtenus, nous aborderons les ouvertures et perspectives possibles de ce travail.

1ère partie: Introduction à l'interaction gamétique

La fécondation est un phénomène déterminant pour assurer le maintien de la vie. Les travaux consacrés à l'apparition de la vie sur la planète ont montré que la reproduction a débuté de façon asexuée chez les formes primitives, et ce il y a environ 3 milliards d'années (notamment chez les virus et les archéobactéries et la plupart des êtres unicellulaires...), la reproduction sexuée n'est apparue que plus tard, il y a environ 650 millions d'années.

Chez les mammifères, la fécondation est la rencontre de deux gamètes, cellules sexuelles hautement différenciées, qui vont se reconnaître spécifiquement, adhérer, fusionner et engendrer une cellule unique : le zygote ou œuf. Si le processus échoue, les deux cellules vont dégénérer rapidement (Wassarman 1999). L'interaction entre ces deux gamètes a fait l'objet de nombreux travaux mais peu de choses sont connues concernant les mécanismes membranaires et protéiques qui sont mis en jeu.

Cette partie sera consacrée à la présentation de l'interaction gamétique. Dans un premier chapitre, nous décrirons les cellules gamétiques et les processus impliqués dans leur maturation puis nous expliquerons les différentes étapes du déroulement de la fécondation. Le deuxième chapitre traitera des processus d'adhésion et de fusion et plus particulièrement des acteurs protéiques impliqués. La protéine spermatique Izumo1 fera, quant à elle, l'objet du troisième chapitre.

Chapitre 1 / Les gamètes et la fécondation

1. Le gamète femelle : l'ovocyte II

Les ovocytes se forment lors de la vie embryonnaire. Ils se multiplient et croissent jusqu'à la naissance où ce processus va s'arrêter. A ce stade, les ovocytes sont appelés ovocytes I ou ovocytes primaires. Ils seront ainsi stockés dans l'ovaire durant toute la période de l'enfance. La phase de maturation redémarre à la puberté lors de l'ovulation. L'ovocyte primaire devient ovocyte II ou ovocyte secondaire.

L'ovocyte « fécondable » quitte donc l'ovaire au stade d'ovocyte II. Il est représenté Figure 1. C'est une cellule de grande taille, 80 μm de diamètre chez la souris et 120 μm chez la femme, entourée d'un manteau de 3 glycoprotéines (ZP1, ZP2, ZP3) chez les mammifères non humains et 4 chez l'homme (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4)(Gupta & Bhandari 2011), appelé zone pellucide (ZP). La zone pellucide joue un rôle important en prévenant la polyspermie (un ovocyte n'est viable que s'il est fécondé par un seul spermatozoïde). C'est également essentiellement à son niveau que se fait la reconnaissance d'espèces (un spermatozoïde d'une espèce ne pourra pas traverser la ZP d'un ovocyte d'une autre espèce). L'espace compris entre la membrane plasmique ovocytaire et la zone pellucide (ZP) est appelé l'espace périvitellin.

La membrane cytoplasmique de l'ovocyte est recouverte de microvillosités. Ce sont des protrusions membranaires maintenues par un cytosquelette d'actine. Elles permettent une augmentation importante de la zone de contact potentielle avec la tête du spermatozoïde et interviennent lors de l'internalisation de ce dernier (processus qui consiste en l'incorporation du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte). Notre travail a été mené chez la souris. La membrane cytoplasmique des ovocytes de souris a deux zones différentes. La première est la zone dite microvillaire, elle correspond à environ 70% de la membrane et est riche en microvillosités. La seconde est la zone amicrovillaire. Les 30% de la membrane ovocytaire correspondant à la zone amicrovillaire sont très pauvres en villosités. Elle se situe en regard du fuseau mitotique. A ce niveau, les spermatozoïdes adhèrent moins à l'ovocyte et y fusionnent peu ou pas (Runge et al. 2007). Les ovocytes humains sont dépourvus de zone amicrovillaire.

Le cytoplasme de l'ovocyte II est riche en organelles. Il s'agit surtout des mitochondries et du réticulum endoplasmique lisse impliqués dans la régulation et le stockage du calcium (Balakier et al. 2002). Les granules corticaux, situés au niveau du cytoplasme sous-cortical, jouent un rôle important dans l'empêchement de la polyspermie : ils proviennent de l'appareil de Golgi et contiennent des glycosaminoglycanes, des phosphatases acides, des peroxidases et des protéases telle que

l'Ovastacin (Burkart et al. 2012; Wessel et al. 2001). Cette dernière, après la pénétration d'un premier spermatozoïde rend la zone pellucide impénétrable par d'autres spermatozoïdes (Talbot & Dandekar 2003).

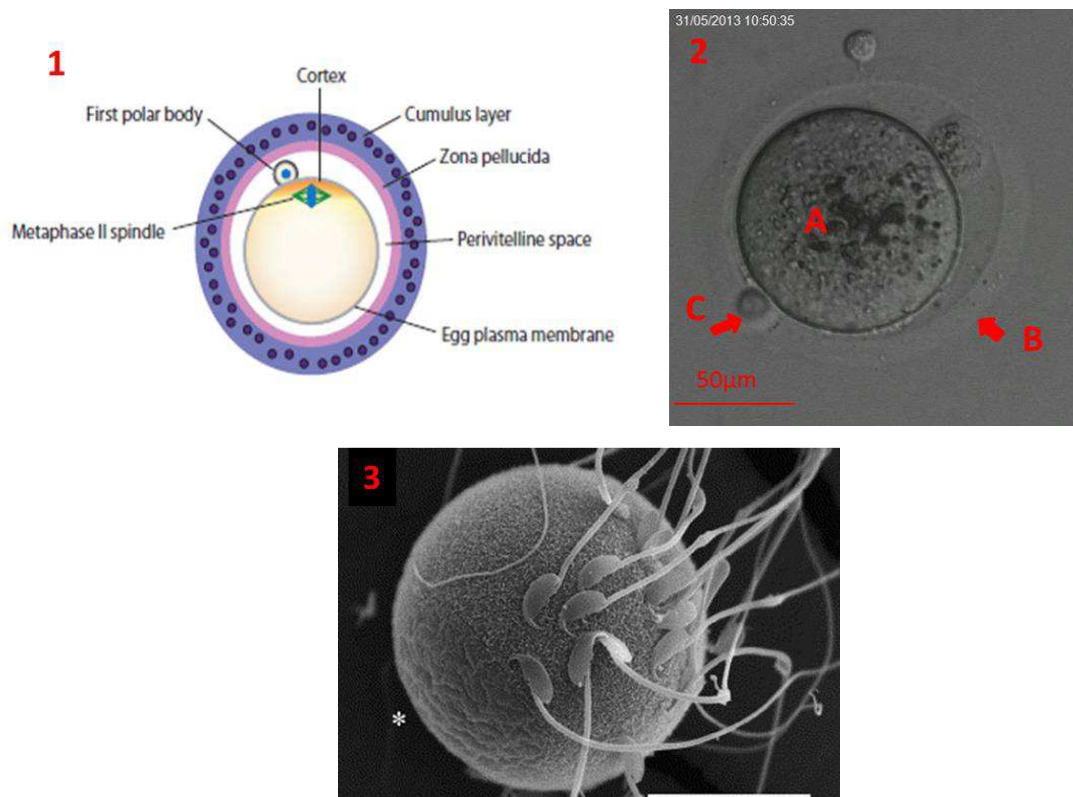


Figure 1: 1/Vue schématique d'un ovocyte II et ayant expulsé son premier globule polaire (Evans 2012). 2/ Ovocyte II ayant expulsé son premier globule polaire en Microscopie Confocale en Transmission. (A) Ovocyte II ayant éjecté son 1er globule polaire. (B) Zone pellucide. (C) Cellule du cumulus. Le cytoplasme de l'ovocyte est riche en organelles et est entouré de la zone pellucide. Entre l'ovocyte et la zone pellucide se trouve l'espace périvitellin. 3/ Spermatozoïdes de souris fécondant un ovocyte. La zone amicrovillaire marquée par * est visible : zone lisse et sans villosités. Les spermatozoïdes adhèrent préférentiellement au niveau de la zone microvillaire. Les spermatozoïdes sont nombreux car l'ovocyte est dépellucidé. Dans le cas des ovocytes ZP- ; plusieurs spermatozoïdes peuvent adhérer et fusionner car la ZP est impliquée dans la prévention de la polyspermie. (Runge et al. 2007).

L'ovocyte II est entouré par un nuage cellulaire, le cumulus oophorus qui est composé d'environ 20 000 cellules folliculaires de la granulosa maintenues entre elles en réseau par une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire est faite principalement d'acide hyaluronique (Figure 2). Ces cellules persistent jusqu'à 72 heures après la fécondation (Familiari et al. 2006). Les cellules les plus internes de la granulosa constituent la corona radiata : ce sont des cellules qui émettent des extensions cytoplasmiques à travers la zone pellucide formant ainsi des « Gap

Junctions » ou jonctions communicantes. Leur principale fonction est de nourrir l'ovocyte. Plus à l'extérieur, se trouvent des cellules qui constituent une sous-population différente et qui forment le plus grand nombre des cellules du cumulus. Elles sont responsables de la synthèse de la progestérone (hormone ayant un rôle important dans le chimiotactisme des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles) (Tanghe et al. 2002; Yokoo & Sato 2004; Lishko et al. 2011) ainsi que du VEGF (Vascular endothelial growth factor) et des cytokines (Interleukines et Tumor Necrosis Factor : $TNF-\alpha$). Des travaux de fécondation in vitro ont montré que de meilleurs taux d'implantation embryonnaire étaient obtenus si les ovocytes étaient maintenus dans le cumulus, suggérant ainsi que ces cellules jouent également un rôle important dans les premiers stades du développement embryonnaire (Carrell et al. 1999).

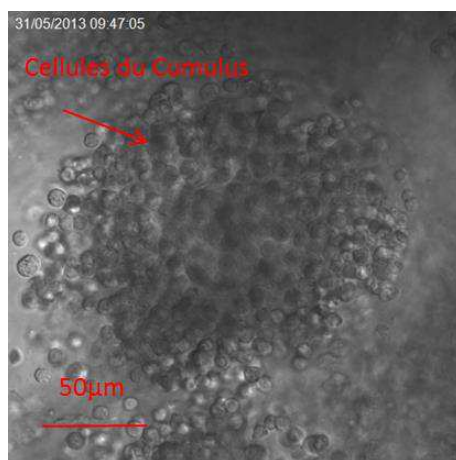


Figure 2: Ovocyte II non fécondé (image en microscopie optique grossissement x 10). Les cellules du cumulus sont visibles. Elles forment un nuage autour de l'ovocyte.

La réserve d'ovocytes se forme lors de la vie fœtale. Leur nombre baisse au cours de la vie jusqu'à arrêt complet lors de la ménopause. Mais ce dogme est depuis quelques années remis en question et des études récentes ont montré la possibilité d'un renouvellement des ovocytes chez les mammifères : Johnson et al. ont montré la présence d'une division mitotique des gonocytes (cellules précurseurs des ovocytes) chez les souris adultes ; Pacchiarotti et al. ont réussi à maintenir en culture une population de gonocytes provenant d'ovaires de souris âgées de 2 à 5 jours. La question est encore sujette à controverse et le débat passionne la communauté scientifique (Johnson et al. 2004; Pacchiarotti et al. 2010; Skaznik-Wikiel et al. 2007; Byskov et al. 2005).

2. Le gamète mâle : le spermatozoïde

Comparativement à l'ovocyte, le spermatozoïde de souris est une cellule de petite taille, comprenant une tête aplatie de $5 \times 1 \mu m^2$ seulement, reliée à un flagelle de $80 \mu m$ par une pièce intermédiaire (Figures 3a et 3b). Le battement de son flagelle rend cette cellule très mobile.

La tête comprend essentiellement de l'ADN sous forme très condensée et l'acrosome, vésicule où le matériel enzymatique nécessaire à la pénétration du cumulus et de la zone pellucide est stocké. La tête peut être subdivisée en 3 sous-régions : région acrosomique, la zone équatoriale et la région post-acrosomale (Figure 3a). La membrane acrosomique sous-jacente à la membrane plasmique est appelée membrane acrosomique externe et celle recouvrant le noyau est appelée membrane acrosomique interne. La pièce intermédiaire est riche en mitochondries (le manchon mitochondrial), qui permettent de produire l'énergie nécessaire à la mobilité (Figure 3b). Le flagelle, constitué essentiellement de tubules, permet ainsi la motricité de la cellule (Figure 3b).

Les spermatozoïdes sont produits dans les tubes séminifères des testicules. Ils vont ensuite être stockés dans les épидидymes où ils commencent leur maturation. Cette maturation implique des modifications biochimiques et fonctionnelles permettant l'acquisition de la motilité et la capacité de la pénétration dans les différentes enveloppes de l'ovocyte (Borg et al. 2010).

L'éjaculat comprend à 90% le liquide séminal venant de la vésicule séminale, de la prostate et des glandes accessoires (Cowper). Les spermatozoïdes constituent seulement 10% de cet éjaculat. Néanmoins, ils sont très nombreux, de plusieurs dizaines de milliers à plusieurs millions selon l'espèce. A l'arrivée dans le vagin, un grand nombre sera détruit par le milieu vaginal hostile aux spermatozoïdes par son acidité, de nombreux autres encore resteront prisonniers du bouchon muqueux à l'entrée du col. Ce bouchon muqueux va servir de filtre et éliminer les spermatozoïdes malformés ou anormalement motiles.

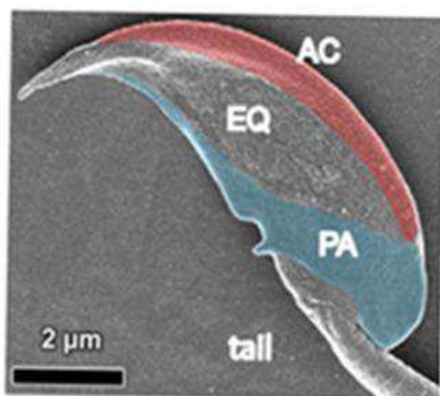


Figure 3a: Schéma de la tête d'un spermatozoïde de souris. AC (région acrosomique) ; EQ (zone équatoriale) ; PA (région postacrosomale).(Satouh et al. 2012).

Les spermatozoïdes fraîchement éjaculés sont immatures et ne peuvent pas féconder l'ovocyte. Une partie de cette maturation est effectuée dans le tractus génital masculin, mais le spermatozoïde ne sera réellement fécondant que lorsqu'il aura effectué la fin de sa maturation dans les voies génitales femelles à savoir sa capacitation et sa réaction acrosomique (Jan et al. 2012).

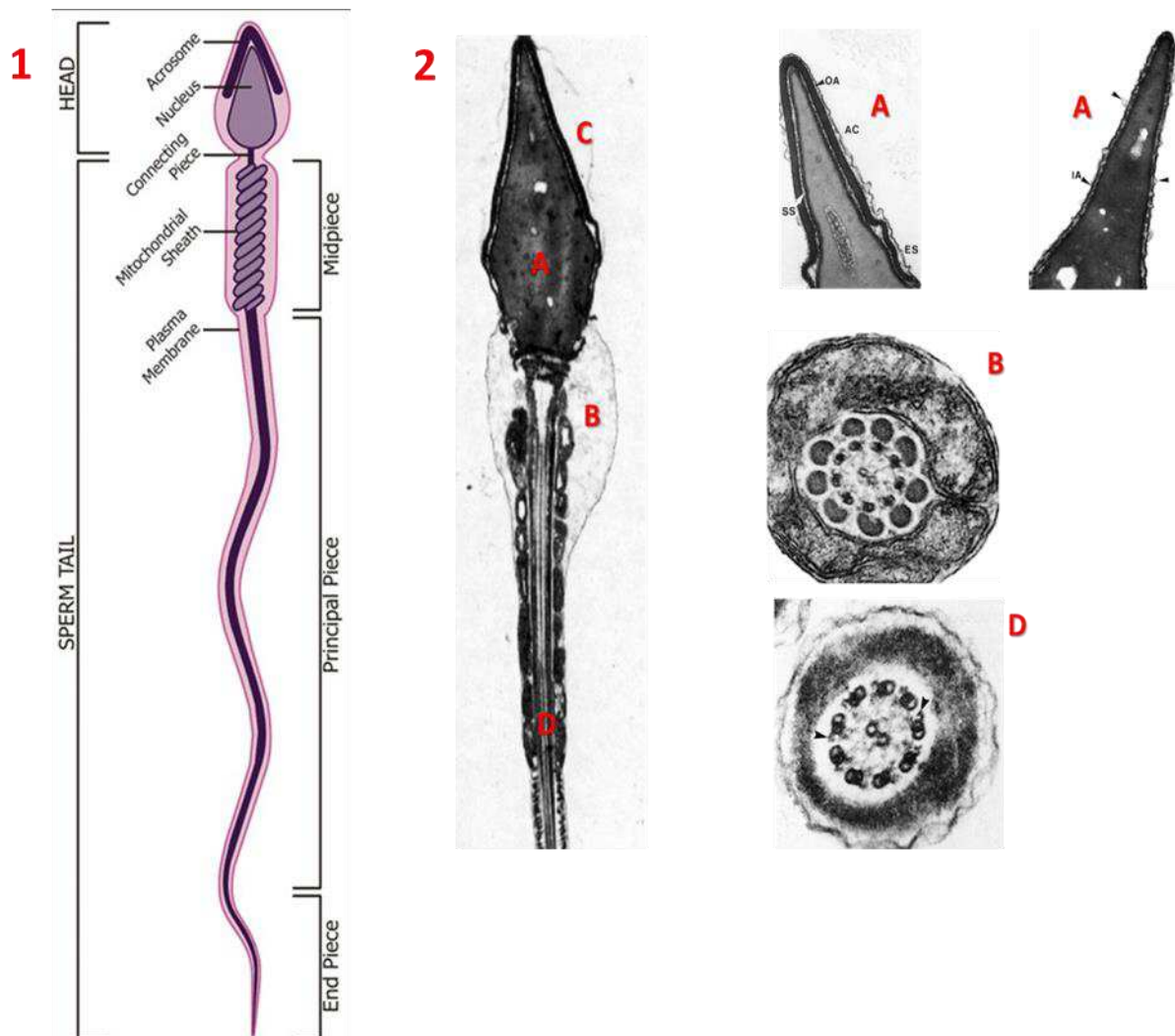


Figure 3b: 1/ Vue schématique du spermatozoïde normal sans réaction acrosomique. La tête comprend essentiellement de l'ADN sous forme condensée. Elle est coiffée par l'acrosome. La pièce intermédiaire renferme le manchon mitochondrial. Le flagelle est constitué essentiellement de tubules permettant la motilité. Lors de la capacitation, le flagelle effectue des mouvements amples en coups de fouet signant l'hyperactivité. Le flagelle doit être souple et non coudé. Lors de la réaction acrosomique, le spermatozoïde perd son acrosome. Adapté de (Borg et al. 2010). 2/ Spermatozoïde normal non acrosome réagit (Microscopie Electronique en Transmission 13000X). A : Tête : essentiellement de l'ADN condensé. B : Pièce intermédiaire. C : Acrosome. D : Queue. (Familiari et al. 2006).

a. La capacitation

C'est lors de la remontée dans les voies génitales femelles que les spermatozoïdes vont accomplir leur capacitation. Il s'agit d'un processus complexe qui se produit grâce aux sécrétions du tractus génital féminin. L'ovocyte sécrète des substances chimiotactiques, notamment la progestérone, pour attirer les spermatozoïdes jusqu'à l'oviducte (Lishko et al. 2011; Harper et al. 2008).

La progestérone induit également la dépolarisation de la membrane spermatique et l'entrée du calcium (C Patrat et al. 2000). L'influx de Ca^{2+} produit une augmentation de la concentration en adénosine monophosphate cyclique (cAMP) qui va permettre d'accroître la motilité du spermatozoïde. La capacitation induit également une réorganisation des protéines de la membrane cellulaire afin que la réaction acrosomique puisse avoir lieu (Gadella 2008; Brewis & Gadella 2010; Miranda et al. 2009; Myles et al. 1987). Ainsi les spermatozoïdes ayant accompli leur capacitation deviennent « hyperactifs », ayant un mouvement de flagelle ample et par saccades. C'est un mouvement caractéristique en coup de fouet qui constitue un bon indicateur de leur qualité. Toutefois seulement 30% des spermatozoïdes normalement motiles vont réussir à adhérer à la zone pellucide (Liu 2003; Miranda et al. 2009).

La capacitation peut être induite in vitro grâce à l'addition d'électrolytes (Ca^{2+}) et de l'albumine dans des proportions qui reproduisent partiellement les conditions des fluides féminins (P E Visconti & Kopf 1998; B M Gadella 2008). C'est cette technique que nous avons adopté lors des expériences de fécondation in-vitro qui seront exposées plus loin dans cette thèse.

b. La réaction acrosomique

La réaction acrosomique (RA) est un processus d'exocytose par fusion des membranes plasmique et externe de l'acrosome. Grâce à son mouvement hyperactif et à plusieurs enzymes dont la PH-20 ou le glycosylphosphatidylinositol GPI-anchored hyaluronidase, le spermatozoïde se fraye un passage à travers le cumulus oophorus (Primakoff & Myles 2002; Baba et al. 2002). Arrivé au contact de la zone pellucide le spermatozoïde se fixe par la partie antérieure de sa tête à la glycoprotéine ZP3, traverse la zone pellucide et se retrouve dans l'espace périvitellin (van Gestel et al. 2007; Wassarman et al. 2001; Wassarman 2009; Gadella 2008) (Figure 4). Le moment exact où a lieu la réaction acrosomique est sujet à débat : certains soutiennent la thèse que le spermatozoïde effectue sa réaction acrosomique lors de la traversée du cumulus, d'autres affirment qu'elle a lieu au moment de l'adhésion à la zone pellucide (Yanagimachi 2011; Baba et al. 2002; Jin et al. 2011; Miranda et al. 2009; Visconti & Kopf 1998).

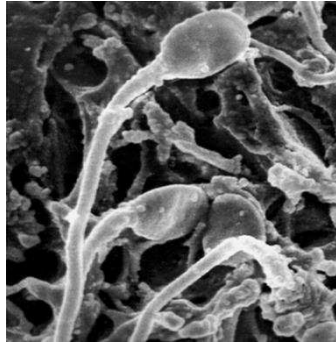


Figure 4 : Spermatozoïdes humains tentant de pénétrer la zone pellucide. Microscopie électronique 7000X. (Familiari et al. 2006).

La réaction acrosomique va aboutir à la libération de la machinerie enzymatique contenue dans la vésicule acrosomique. La présence de Ca^{2+} dans les fluides génitaux est indispensable à son accomplissement (Nakanishi et al. 2001). Suite à l'afflux intra cellulaire de Ca^{2+} , l'acrosine et la hyaluronidase vont être libérées. La hyaluronidase va lyser la matrice d'acide hyaluronique et l'acrosine va hydrolyser une glycoprotéine de la zone pellucide la ZP1. Les deux autres glycoprotéines de la zone pellucide, ZP2 et ZP3 chez la souris, vont devenir moins résistantes et laisser passer les spermatozoïdes qui, grâce à l'hyperactivité de leur flagelle, traversent la ZP et viennent se mettre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte (Dean 2004; S. K. Gupta & Bhandari 2011).

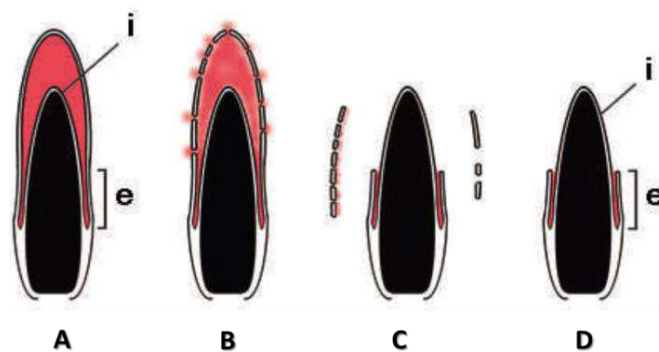


Figure 5: Schéma des différentes étapes de la réaction acrosomique d'un spermatozoïde capité. (i) : membrane acrosomique interne. (e): membrane plasmique: zone où aura lieu la fusion. (A) Spermatozoïde acrosome intact. (B) fusion en de multiples points de la membrane externe de l'acrosome avec la membrane plasmique. (C) vésiculation (D) état final du spermatozoïde acrosome réagi : la partie antérieure de la tête n'est recouverte que par la membrane interne de l'acrosome. Au niveau de la zone équatoriale se superposeront les deux membranes acrosomiques interne et externe ainsi que la membrane plasmique. Adapté de Yanagimachi 2011. (Yanagimachi 2011).

Une fois la réaction acrosomique accomplie, le spermatozoïde présente ce qui était la membrane acrosomique interne au niveau du segment antérieur. Au niveau de la zone équatoriale se superposeront les deux membranes acrosomique interne et externe ainsi que la membrane plasmique (Tomes 2007; De Blas et al. 2005; Nakanishi et al. 2001; Catherine Patrat et al. 2000). Les différentes étapes sont détaillées dans la figure 5. Comme la capacitation, la réaction acrosomique peut être induite in vitro grâce à l'addition d'électrolytes (Ca^{2+}) (Nakanishi et al. 1999).

Chapitre 2 / L'adhésion et la fusion dans l'interaction gamétique et les acteurs moléculaires

Pendant longtemps l'interaction gamétique a été assimilée à la seule étape de fusion des gamètes. Dans sa dernière revue de 2012, Janice Evans revient sur la nécessité de faire la distinction entre les deux étapes d'adhésion et de fusion (Evans 2012) car l'adhésion, précédant la fusion, joue un rôle à part entière et essentiel dans le processus de fécondation. Par ailleurs, l'interaction entre ovocyte et spermatozoïde a longtemps été étudiée comme un phénomène impliquant des interactions uniquement en Trans (entre les molécules des deux gamètes). Mais des études récentes ont montré que certaines molécules considérées comme impliquées ou même indispensables dans ces mécanismes d'adhésion et de fusion, interviennent également voire principalement à travers des interactions en Cis (avec des partenaires sur la même membrane).

1. L'adhésion et la fusion cellulaire

a. L'adhésion cellulaire

L'adhésion d'une cellule à une autre cellule ou à la matrice extracellulaire est fondamentale pour le développement tissulaire normal, les fonctions immunitaires, le développement embryonnaire et le processus de fécondation (Thiery 2003). Mais les phénomènes d'adhésion peuvent être observés également dans certaines pathologies telles les infections virales et bactériennes ou dans les cas des métastases. Les adhésions cellule-cellule peuvent être de type structural et permettre la constitution de tissus ou de type transitoire et effectuer une fonction biologique déterminée. Les cellules qui adhèrent entre elles interagissent dans un système organisé qui permet le maintien de l'homéostasie (Costa & Parsons 2010; Wozniak et al. 2004).

Cette adhésion est assurée par un certain nombre de protéines dites « adhésives » qui sont les intégrines, les cadhérines, les sélectines et les membres de la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des protéines membranaires, souvent liées au cytosquelette et qui vont développer des interactions ligand-récepteur (Ruoslahti & Obrink 1996; Finaz & Hammami-Hamza 2000; Aricescu & Jones 2007; Berditchevski & Odintsova 1999; Rosales & Brien 1995). Une molécule d'adhésion permet d'établir la liaison entre deux cellules de même type ou de type différent en se liant à un ligand, qui peut être une molécule semblable ou distincte mais dans tous les cas, il y a une reconnaissance spécifique entre les molécules qui existent à la surface des cellules en question (Martinez-Rico et al. 2005; Evans & Ritchie 1997).

Dans le cadre de la fécondation, l'adhésion intervient quand le spermatozoïde ayant traversé la zone pellucide arrive au contact de la membrane cytoplasmique de l'ovocyte et adhère. L'évaluation de l'adhésion durant la fécondation est délicate. Le manque d'information concernant le processus d'adhésion des gamètes et la difficulté à caractériser cette étape de la fécondation par les techniques de biologie traditionnelles avait motivé l'équipe à mettre au point une approche expérimentale issue de la physique permettant d'étudier spécifiquement l'adhésion entre un spermatozoïde et un ovocyte unique permettant de sonder directement et quantitativement l'adhésion entre les deux gamètes isolées, comme c'est le cas dans la nature. Dans le cadre de la thèse d'Antoine Jégou, il a été montré que plusieurs types d'adhésion existaient entre le spermatozoïde et l'ovocyte, certaines efficaces pour la fusion, les autres non (Jégou 2008; Jégou et al. 2011; Jégou et al. 2008). Plusieurs protéines sont impliquées dans ce processus. Ces protéines sont présentes au niveau de la zone antérieure sur la membrane interne de ce qui fut l'acrosome et au niveau de la zone équatoriale. C'est au niveau de cette région que l'adhésion conduisant à la fusion aura lieu (Gadella 2008; Satouh et al. 2012; Fujihara et al. 2010; Vjugina et al. 2009).

b. La fusion cellulaire

La fusion membranaire est le processus par lequel deux bicouches lipidiques vont fusionner et créer l'union de deux compartiments distincts. C'est un phénomène spécifique avec un compartiment donneur et un compartiment receveur. Dans le cas des cellules la fusion peut être hétérotypique (deux cellules différentes : c'est le cas de la fécondation) ou homotypique (par exemple la fusion des cellules géantes qui proviennent de la fusion des monocytes et des myotubes qui proviennent de la fusion des myoblastes) (Chen et al. 2007). La fusion est essentielle pour plusieurs mécanismes de la vie de la cellule : le trafic membranaire, les phénomènes d'exocytose, les processus immunitaires (lors de la formation ostéoclastes et des cellules géantes), les mitochondries... La fusion joue également un rôle prépondérant dans l'infection virale (pour la revue (Martens & McMahon 2008)).

Dans la fécondation le début de la fusion se traduit par l'arrêt de l'hyperactivité (arrêt du battement du flagelle) du spermatozoïde. Les rares images qui décrivent le déroulement de cette étape clé de la fécondation sont données essentiellement par la microscopie électronique (Familiari et al. 2006 ; Nagagimachi 1994 ; Chen Sthananthan 1986 ; Sthananthan 1993) (Figure 6A). La fusion débute au niveau de la zone équatoriale, puis la région antérieure de la tête (recouverte par la membrane interne de l'acrosome) est internalisée par un mécanisme très proche de la phagocytose (Bronson 1998) (Figure 6B).

Les expériences de fécondation in-vitro permettant de tester les protéines impliquées dans l'interaction gamétique ne permettent le plus souvent pas de discriminer celles jouant un rôle dans l'adhésion précédant la fusion de celles intervenant directement dans la fusion. Les mécanismes biochimiques associés à ces deux étapes sont mal connus. On note une déplétion des protéines au niveau du cône de fusion (Ziyyat et al. 2006) sans savoir si cette déplétion résulte de la fusion ou lui est antérieure et la favorise. De même Barraud-Lange et al. ont décrit des échanges membranaires et protéiques entre l'ovocyte et le spermatozoïde et ce dès l'arrivée du spermatozoïde dans l'espace périvitellin avant même qu'il y ait fusion entre les membranes. Néanmoins, le rôle joué par ces échanges dans la fécondation reste à élucider (Barraud-Lange, Naud-Barriant, Saffar, et al. 2007). Comme mentionné plus haut, une fois qu'un spermatozoïde a adhéré et fusionné, il devient primordial, pour la viabilité de l'œuf, de ne laisser aucun autre spermatozoïde entrer. L'œuf s'active alors et une cascade de réactions est déclenchée pour aboutir à l'empêchement de la polyspermie.

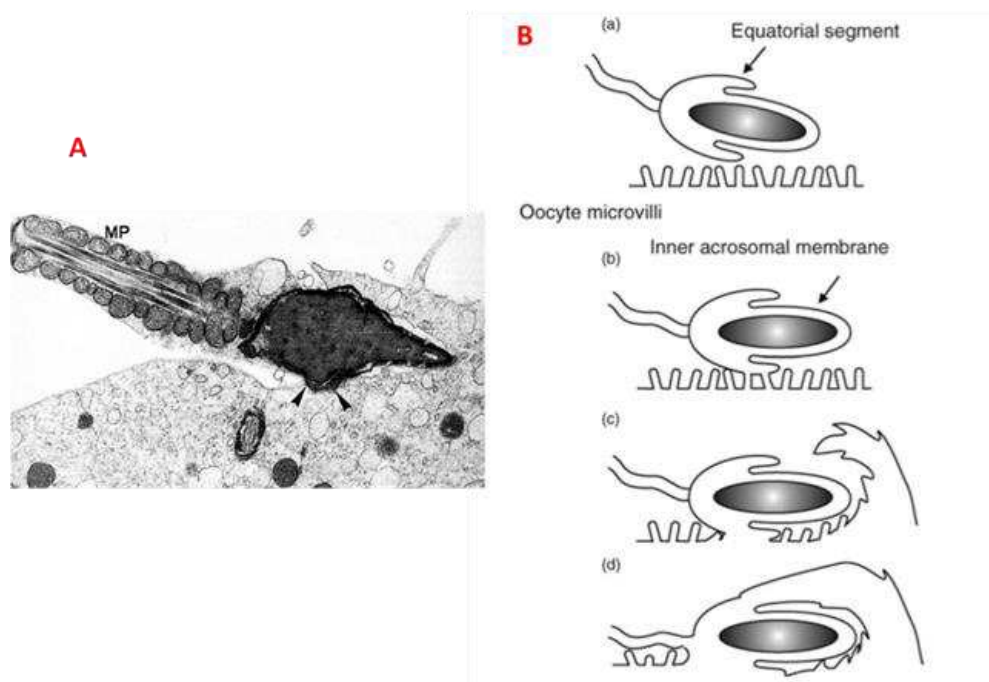


Figure 6 : A/ Fusion. Le spermatozoïde adhère à l'ovocyte tangentiellement par son segment équatorial. Il est internalisé par un mécanisme proche de la phagocytose. Les flèches indiquent le début de la fusion. Microscopie électronique 27300X. (Familiari et al. 2006). B/ Représentation schématisée de l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte. (a) Le contact a lieu entre le spermatozoïde et les villosités de l'ovocyte; (b) la fusion débute au niveau de la partie équatoriale de la tête du spermatozoïde; (c,d) la partie antérieure de la tête est intégrée à l'ovocyte par un mécanisme proche de la phagocytose. Au final, tout le «contenu» du spermatozoïde est intégré au cytoplasme de l'ovocyte. Adapté de Yanagimachi (1994).

2. Les acteurs protéiques impliqués dans l'interaction gamétique

Un nombre important de molécules ont été identifiées, ces dernières années, comme jouant un rôle dans l'interaction gamétique (Rubinstein, Ziyat, Wolf, et al. 2006; Evans 2012; Inoue et al. 2011). La détermination des molécules candidates a débuté par l'utilisation des anticorps bloquants lors d'expériences de fécondation in-vitro. Plus récemment les travaux de protéomique ont permis, en plus d'identifier d'autres molécules, de montrer que les molécules candidates avaient une activité également en Cis et pouvaient former des complexes protéiques (M. J. Wolkowicz et al. 2008; Nishimura et al. 2011; Stein et al. 2006). Plusieurs protéines ont semblé alors avoir un rôle pivot dans le processus de fécondation. Néanmoins, la génération de lignées transgéniques délétées de ces acteurs supposés clé de la fécondation a ensuite remis en cause l'implication de certaines protéines et permis d'apporter des réponses quant à l'importance d'autres (Miyado et al. 2000; Le Naour et al. 2000; Inoue et al. 2005).

Cette partie sera consacrée à la description des principales protéines et familles de protéines impliquées dans l'interaction spermatozoïde ovocyte en mettant en avant leur rôle dans l'interaction gamétique.

a. Les acteurs ovocytaires

i. Les tétraspanines : CD9 et CD81

Nous décrirons plus particulièrement les tétraspanines CD9 et CD81 car ce sont les plus impliquées dans le processus d'interaction gamétique.

- **La famille des tétraspanines**

Les tétraspanines constituent une famille de protéines, identifiées en premier sur les leucocytes humains (Hotta et al. 1988; Classon BJ et al. 1990; Classon et al. 1989), largement présentes dans différents organismes. Elles ont été décrites chez les champignons, les plantes, les invertébrés et les mammifères. Elles sont également exprimées par différents tissus et impliquées dans de nombreux processus cellulaires importants : migration, adhésion, fusion, signalisation cellulaire, réponse immunitaire et processus métastatiques. Pour les revues consulter (Charrin et al. 2009; Boucheix & Rubinstein 2001; Hemler 2001; Maecker HT et al. 1997). Les mécanismes par lesquels elles agissent ne sont pas complètement élucidés.

Une caractéristique largement décrite est leur capacité à interagir entre elles et avec d'autres protéines membranaires. Elles induisent la formation de complexes multi-protéiques dynamiques appelés « tetraspanin web » ou toile tétraspanine (Boucheix & Rubinstein 2001; Yáñez-Mó et al.

2009). Les principaux partenaires rapportés sont les intégrines (Ziyyat et al. 2006; Yang et al. 2006; Berditchevski & Odintsova 1999; Miller et al. 2000; Gutierrez-Lopez et al. 2003; Berditchevski 2001; Ray & Treloar 2012) mais également des protéines de la superfamille des immunoglobulines (Le Naour et al. 2004; Charrin et al. 2003; He et al. 2009; Stipp et al. 2001). La palmitoylation est directement impliquée dans la formation de ces complexes (Yang et al. 2004). Outre ces liaisons développées en Cis, les tétraspanines peuvent également constituer des récepteurs à d'autres protéines en développant des liaisons en Trans (Waterhouse et al. 2002).

- **Leur structure**

Les tétraspanines sont des glycoprotéines très conservées de 204 à 305 acides aminés ayant quatre domaines transmembranaires, deux queues cytoplasmiques courtes en N- et en C-terminal et deux boucles extracellulaires : une longue et une courte (voir la Figure 7 pour l'illustration : la tétraspanine CD9).

Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été rapportées dont la palmitoylation (Charrin et al. 2002; Yang et al. 2004), la glycosylation (seule la CD81 n'a pas de site de N-glycosylation) et la phosphorylation (Stipp et al. 2003; Wang et al. 2011; Boucheix et al. 1991) dont l'importance dans la fécondation sera évoquée plus loin .

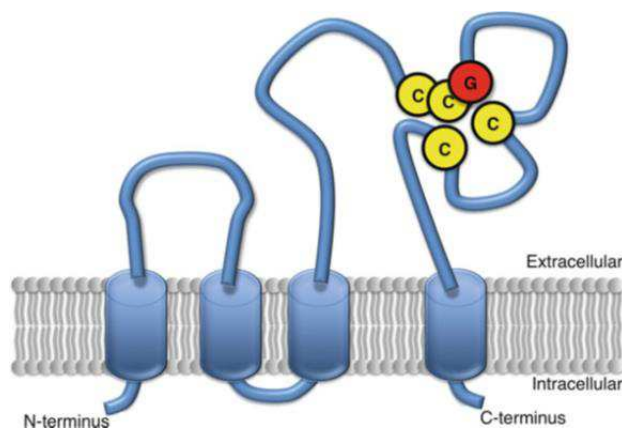


Figure 7/ Exemple de la structure d'une tétraspanine : structure de la tétraspanine CD9. Glycoprotéine transmembranaire de 228 acides aminés ayant quatre domaines transmembranaires, deux queues cytoplasmiques courtes en N- et en C-terminal et deux boucles extracellulaires ; une longue et une courte. C : cystéine. G : N-glycosylation. Sa masse est de 24 kDa. (Kawano et al. 2011).

- **Rôle de CD9 et de CD81 dans la fécondation**

Il a été montré que les tétraspanines sont impliquées dans différents processus fusionnels en tant que molécules pro ou anti-fusogènes. CD9 favorise la formation de syncytia (cellules multinucléées) de cellules infectées par le virus canin VCD (Canine distemper virus) (Löffler et al. 1997). En revanche la présence d'anticorps anti-CD81 et anti-CD9 augmentent la formation des syncytia de cellules infectées par le VIH-1, l'hyper-expression de CD9 chez des cellules infectées par le HIV-1

diminue la transmission intercellulaire de ce dernier (Weng et al. 2009; Kremmentsov et al. 2009). CD9 et CD81 fonctionnent en synergie pour limiter la fusion des monocytes (cellules hématopoïétiques circulantes qui peuvent se différencier en macrophages dans les tissus) et prévenir la formation de cellules géantes multi-nucléées (MGC) (Takeda et al. 2003).

De même, CD9 est impliqué dans les processus fusionnels lors de la fécondation. La première preuve a été expérimentale : l'anticorps monoclonal JF9 dirigé contre CD9 inhibe la fusion gamétique et ce de manière dose dépendante (Chen et al. 1999).

Le phénotype majeur observé sur des souris KO pour cette protéine est une forte réduction de la fertilité des femelles (chute de plus de 95% du taux de fécondation) causée par un défaut de fusion des gamètes. . Lors d'expériences de fécondation in-vitro, les spermatozoïdes adhèrent à l'ovocyte CD9^{-/-} mais ne peuvent fusionner. En revanche, en s'affranchissant de cette étape de fusion en injectant un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte CD9^{-/-}, le processus de fécondation peut se poursuivre (Le Naour et al. 2000; Miyado et al. 2000; Kaji et al. 2000; Ziyat et al. 2006).

Les souris KO pour CD81 présentent également un défaut de fertilité, moins sévère cependant que celui observé pour CD9. Ces souris ont des taux de fertilités de 40% inférieurs à la normale (Rubinstein, Ziyat, Prenant, et al. 2006).

Le double KO CD9 et CD81 est quant à lui complètement stérile suggérant une interaction entre ces deux protéines (Rubinstein, Ziyat, Wolf, et al. 2006; Ziyat et al. 2006). Mais cette question est encore sujette à débat et a été dernièrement contredite par l'équipe de Miyado (Ohnami et al. 2012).

Si l'importance de ces 2 protéines dans le processus de fusion est clairement établi, les mécanismes par lesquels elles interviennent ne sont pas encore compris (Evans 2012). Plusieurs scénarios ont notamment été proposés pour la tétraspanine CD9 :

- ✓ Une action en CIS : CD9 interagit avec d'autres protéines de la membrane ovocytaire développant des interactions en Cis. Ces complexes moléculaires joueraient le rôle d'une plateforme d'adhésion solide permettant la fusion. Dans le cadre de la thèse d'Antoine Jégou, notre équipe a montré que CD9 organisait des sites d'adhésion permettant de stabiliser le spermatozoïde plaqué à l'ovocyte, ce qui n'est pas le cas en l'absence de CD9 (Jégou et al. 2011).
- ✓ Un lien en Trans : CD9 a également été décrite comme un récepteur direct de la PSG17 (Pregnancy-Specific Glycoprotein 17) : une protéine soluble de la superfamille des immunoglobulines sécrétée par le placenta (Waterhouse et al. 2002; Ellerman et al. 2003). Il

n'est donc pas exclu que CD9 puisse interagir avec un membre de la superfamille des immunoglobulines présent à la surface du spermatozoïde.

- ✓ Une régulation de la structure des microvillosités : Les spermatozoïdes se fixent préférentiellement au niveau des zones riches en microvillosités. Or les ovocytes CD9 KO présentent des anomalies des microvillosités avec des microvillosités moins nombreuses et plus courtes que sur les ovocytes sauvages (Runge et al. 2007).

ii. Les Intégrines

• La famille des Intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans les processus d'adhésion cellule-cellule, dans la migration, la division et la réponse au stress mécanique (Bowen & Hunt 2000). Elles ont été décrites pour la première fois en 1986 par Tamkun et al. (Tamkun et al. 1986).

• Leur structure

Les intégrines sont des protéines transmembranaires formant des hétérodimères constitués d'une sous unité α et d'une sous unité β liées d'une manière covalente. 18 sous unités α et 8 sous unités β ont été décrites à ce jour, les différentes combinaisons connues donnant 24 intégrines différentes (Evans 2001; Bowen & Hunt 2000). Ce sont des récepteurs cations (Ca^{2+}) dépendants, capables de reconnaître des corécepteurs de la famille des immunoglobulines et des cadhérines. Elles ont un domaine extracellulaire en N-terminal, un domaine transmembranaire et une petite queue cytosolique en C-terminal (Figure 8) (Springer & Wang 2004).

Les intégrines sont liées au cytosquelette par le biais d'autres protéines telles que la taline, la paxiline et la vinculine qui se fixent à l'actine F. Cette adhésion se fait par le biais de la sous unité β et permet la transduction de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule (Brakebusch & Fassler 2003; Geiger & Bershadsky 2002). L'activation de l'intégrine se fait par le biais d'un changement de sa conformation qui va entraîner le démasquage d'un site d'adhésion. La liaison au récepteur va se faire par la sous-unité α (Bowen & Hunt 2000; Schwartz 2001).

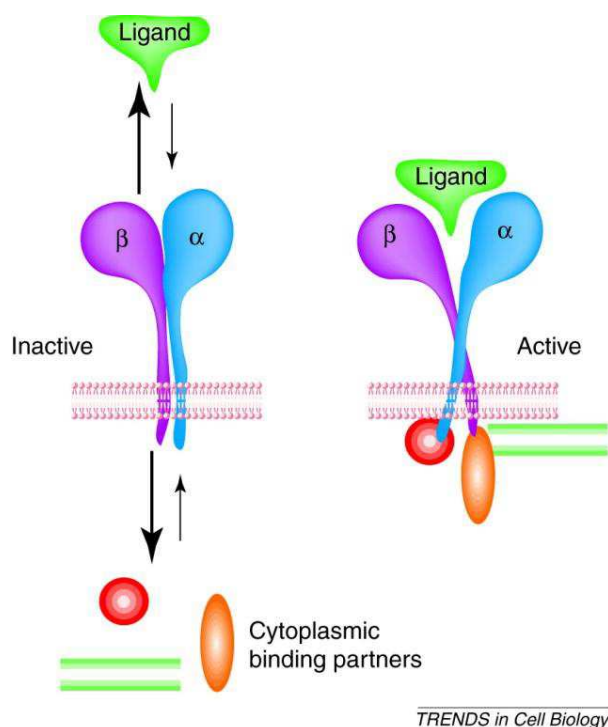


Figure 8 : Hétérodimère formé par une sous unité α et d'une sous unité β liées d'une manière covalente. A gauche l'intégrine dans sa conformation inactive, à droite dans sa conformation activée (elle se lie alors au cytosquelette). La liaison au récepteur va se faire par la sous-unité α (Schwartz 2001).

- **Rôle des intégrines dans la fécondation**

Leur rôle dans l'interaction gamétique a été rapporté pour la première fois par Almeida et al. en 1995, qui a identifié l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ lors d'expériences d'inhibition de FIV par l'anticorps GoH3, anticorps bloquant (Almeida et al. 1995). L'intérêt pour cette famille de protéines a augmenté lors de travaux ultérieurs qui ont montré leur interactions avec les protéines de la famille des ADAMs notamment ADAM2 portées par la membrane spermatique (Burns 2002; Evans et al. 1995; Evans 1999; Tarone et al. 1993). Barraud-Lange et al. ont montré que l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ était également présente à la surface du spermatozoïde (Barraud-Lange, Naud-Barriant, Saffar, et al. 2007).

Toutefois, les travaux sur animaux transgéniques portant sur les invalidations de gènes pour ces protéines de la membrane ovocytaire ont ensuite montré que les lignées KO pour différentes intégrines sont fertiles (Sengoku et al. 2004; Evans et al. 1995; Bayas et al. 2006; He et al. 2003). Au vu du grand nombre des membres de cette famille il n'est pas exclu qu'en l'absence d'une intégrine, la fécondation puisse avoir lieu du fait du rôle redondant de plusieurs intégrines.

iii. Les Ancres membranaires : GPI-anchored proteins

Les ancras GPI sont des protéines « ancrées » à la membrane plasmique grâce à un glycolipide : le glycosyl-phosphatidylinositol. Le rôle actif de la Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchored Protein (GPI-APS dans l'interaction gamétique a été découvert lors d'expériences de fécondation in-vitro menées en présence de phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC). Cette

molécule clive les GPI-anchored proteins. Les spermatozoïdes mis en présence d'ovocytes ayant subi ce traitement adhèrent à la membrane plasmique de l'ovocyte mais ne fusionnent pas (Coonrod et al. 1999).

La génération de lignées délétées de ces protéines uniquement dans l'ovocyte montre que les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin sans fusionner. Les expériences de fécondation in-vitro menées avec cette lignée montrent un taux de fécondation diminué de 90% et un taux d'adhésion diminué de 40% (Alfieri et al. 2003).

b. Les acteurs spermatiques

i. La protéine Izumo1

La protéine Izumo1, constituant l'objectif de notre travail, fera l'objet du chapitre 3 qui suivra.

ii. Les ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease)

- **La famille des ADAMs**

La famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease), est une famille de protéines transmembranaires caractérisée initialement grâce à des études d'analogie avec des métalloprotéases contenues dans le venin de serpent. Les premières ADAMs de mammifères ont été découvertes à la surface de spermatozoïdes de cochon d'inde (Wolfsberg & White 1996; Primakoff et al. 1987). Cette famille de protéines a été appelée ainsi car ses membres possèdent tous un domaine « métalloprotéase » et un domaine « désintégrine ».

- **Leur structure**

Ce sont des glycoprotéines transmembranaires d'environ 750 acides aminés qui ont la capacité de cliver le domaine extracellulaire de nombreuses protéines. La famille des ADAMs est constituée par 39 membres qui possèdent 5 domaines : un pro-domaine, un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine, une région riche en cystéines et une région de type EGF (epidermal growth factor). Les ADAMs sont transmembranaires et ont une queue cytosolique de longueur variable (Alfandari et al. 1999; Rubinstein, Ziyat, Wolf, et al. 2006; Inoue et al. 2011).

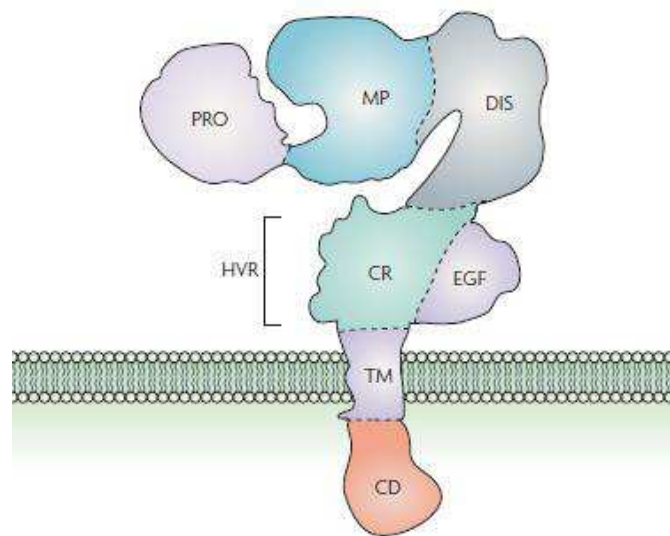


Figure 9: Vue schématique d'une protéine de la famille ADAM. Protéine transmembranaire ayant 5 domaines extracellulaires : un pro-domaine (PRO), un domaine métalloprotéase (MP), un domaine désintégrine (DIS), une région riche en cystéines (CR) et une région de type EGF (epidermal growth factor). Elles sont transmembranaires (TM) et ont une queue cytosolique (CD) de longueur variable (Murphy 2008).

- **Rôle des ADAMs dans l'interaction gamétique**

- ✓ *La fertiline ou le complexe ADAM1/ADAM2*

La fertiline ou complexe PH-30 est constituée de deux sous-unités : la fertiline α dite ADAM1 et la fertiline β dite ADAM2 (Primakoff, Hyatt, & Tredick-Kline, 1987 , Blobel et al. 1992). Des expériences d'immuno-précipitation ont montré que la fertiline β développait une liaison en Trans avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire (Eto et al. 2002). Ces résultats ont alors été étayés par des tests d'inhibition de la fécondation qui ont montré une baisse importante du taux de fécondation mais celle-ci était toutefois encore possible. La génération de souris ko pour la fertiline β a révélé différentes anomalies fonctionnelles, une chute importante du taux de fécondation mais pas de stérilité complète (Nishimura et al. 2001).

- ✓ *La Cyristetine ADAM3*

Les expériences d'inhibition de la fécondation in-vitro ont montré qu'en bloquant le domaine désintégrine d'ADAM3 on observait 80% de baisse du taux d'adhésion et 90% de baisse du taux de fusion (Yuan et al. 1997). De même, les animaux transgéniques délétés pour la Cyristetine ne montrent pas de stérilité totale. Cette protéine semble être impliquée dans le processus d'adhésion du spermatozoïde avec la zone pellucide et non avec la membrane plasmique ovocytaire (Nishimura et al. 2001).

Les protéines de la famille des ADAMs ont pendant longtemps été considérées comme des protéines jouant un rôle clé dans l'interaction gamétique. Mais l'apport des travaux sur les lignées transgéniques KO a montré que bien qu'elles semblent jouer un rôle important dans l'interaction gamétique leur absence n'entraîne pas de stérilité totale. Leur rôle dans l'adhésion/fusion n'est pas complètement élucidé.

iii. SPESP1 (*Sperm Equatorial Segment Protein*)

SPESP1 est une protéine de la région équatoriale et demeure intacte après la réaction acrosomique (Wolkowicz et al. 2003). Les anticorps dirigés contre cette protéine inhibent la fusion entre les spermatozoïdes humains et les ovocytes de hamster (M. J. Wolkowicz et al. 2008). Les spermatozoïdes issus de la lignée KO pour cette protéine montrent une baisse importante du taux de fécondation par défaut de fusion (Fujihara et al. 2010).

Chapitre 3 / La protéine spermatique Izumo1

1. Izumo1 est une protéine clé de la fécondation

En 1986 l'équipe de Masaru Okabe au Japon met en évidence un antigène spermatique qui réagit spécifiquement avec un anticorps monoclonal anti-souris, l'OBF13. Cet anticorps a la particularité d'inhiber la fusion entre un spermatozoïde et un ovocyte (Okabe et al. 1988; Okabe et al. 1987). Les spermatozoïdes mis en présence d'ovocytes dépellucidés (dont la zone pellucide a été enlevée) préincubés avec l'OBF13 sont capables d'adhérer à leur membrane mais la fusion n'a pas lieu. En 2005, l'équipe d'Okabe confirme le caractère indispensable d'Izumo1 dans l'interaction gamétique en générant par recombinaison homologue une lignée de souris Izumo^{-/-}. Les femelles de cette lignée sont normalement fertiles, alors que les mâles délétés en Izumo1 sont totalement stériles. En dépit d'un comportement sexuel standard et de spermatozoïdes de morphologie et motilité normales, l'analyse des ovocytes prélevés chez des femelles sauvages 24 heures après accouplement avec un mâle Izumo1^{-/-} montre que les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin, adhèrent à la membrane ovocytaire mais ne peuvent fusionner. La même observation est faite en réalisant in vitro des inséminations d'ovocytes dépellucidés par des spermatozoïdes Izumo1^{-/-} (Figure 10). En revanche, en court-circuitant l'étape de fusion grâce à l'injection d'un spermatozoïde Izumo^{-/-} directement dans le cytoplasme d'un ovocyte sauvage, la fécondation se poursuit normalement donnant naissance à des portées viables présentant les caractéristiques mendéliennes classiques. Les spermatozoïdes Izumo^{-/-} semblent donc capables de traverser toute les étapes de la fécondation exceptée celle de la fusion et les portées engendrées sont menées à terme donnant naissance à des individus normaux. L'induction d'Izumo dans les spermatozoïdes Izumo^{-/-} restaure totalement la fertilité.

La délétion d'un gène pouvant interférer avec l'expression d'autres gènes ; l'équipe d'Okabe s'est intéressée au taux d'expression sur les spermatozoïdes Izumo1^{-/-} d'autres protéines spermatiques pouvant être impliquées dans la fécondation. Leurs analyses montrent que le taux d'expression d'ADAM2, CD47 et sp57 n'est pas affecté par la délétion d'Izumo.

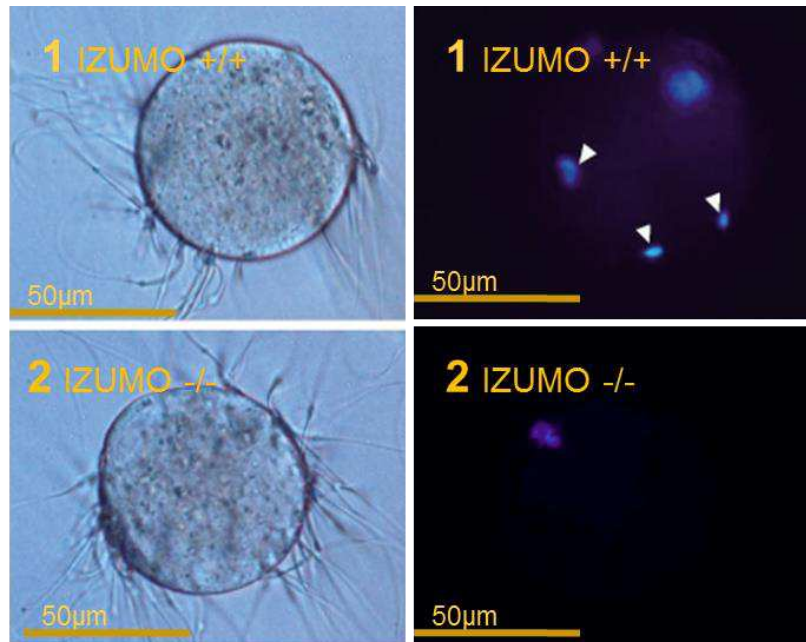


Figure 10 : Les spermatozoïdes *Izumo*^{-/-} ne fécondent pas mais adhèrent à l'ovocyte. 1 /Ovocyte dépellucidé fécondé par des spermatozoïdes *Izumo*^{+/+} : il y a fusion, les flèches indiquent les noyaux décondensés des spermatozoïdes ayant réussi à fusionner. 2/ ovocyte dépellucidé fécondé par des spermatozoïdes *Izumo*^{-/-}, il n'y a pas de fécondation, les spermatozoïdes adhèrent mais ne fusionnent pas. Adapté de (Inoue et al. 2005).

Les ovocytes de hamster dépellucidés pouvant être fécondés par des spermatozoïdes humains (Lee et al. 1997), l'implication d'Izumo1 dans la stérilité chez l'homme a été testée en inséminant des ovocytes de hamster par des spermatozoïdes humains préincubés avec des anticorps anti-Izumo1 humains bloquants. Les résultats sont identiques à ceux obtenus chez la souris suggérant ainsi qu'Izumo1 puisse être impliqué dans la stérilité chez l'homme (N. Inoue et al. 2005).

Les différents travaux portant sur le rôle d'Izumo1 dans la fécondation chez l'homme tendent à montrer qu'Izumo1 pourrait constituer une piste intéressante pour la contraception, mais aucun de ces travaux n'a abouti à une application médicale concrète chez l'humain (Wang et al. 2009; Hayasaka et al. 2007; Naz 2008; Clark & Naz 2013; Granados-Gonzalez et al. 2008).

Izumo1 est à ce jour la seule protéine de la membrane spermatique induisant une infertilité totale (N. Inoue et al. 2005). L'équipe d'Okabe lui donne le nom d'Izumo en l'honneur du temple dédié au mariage (Inoue et al. 2005).

2. Propriétés structurales d'Izumo1

a. Izumo1 : un membre de la superfamille des immunoglobulines (IgSF)

Izumo1 fait partie de la superfamille des Immunoglobulines. Les membres de cette famille possèdent un ou plusieurs domaines immunoglobuline, très conservés, issus de l'expression de gènes évoluant d'un gène ancestral commun (Weinman & Méhul 2004). Cette famille de glycoprotéines comprend de très nombreux membres 765 membres connus chez l'homme, 140 chez la mouche et 64 chez les vers (Brümmendorf & Lemmon 2001; Gupta 2005). La superfamille des immunoglobulines (IgSF) compte parmi ses membres de nombreuses protéines impliquées dans les processus d'adhésion, l'un des processus d'adhésion le plus important est la liaison antigène-anticorps.

Les membres de la superfamille des immunoglobulines ont en commun un domaine de 70 à 110 acides aminés constitué de deux feuillets β antiparallèles, unis par des interactions hydrophobes et une liaison disulfure (Weinman & Méhul 2004).

Ces protéines développent aussi bien des liaisons en Cis que des liaisons en Trans par le biais de leur domaine Immunoglobuline. Elles peuvent réaliser des liaisons en Trans avec d'autres membres de la superfamille des immunoglobulines (liaisons homotypiques) ou avec d'autres molécules telles que les intégrines ou les cadhérines (liaisons hétérotypiques). Elles peuvent aussi interagir en Cis et constituer des complexes protéiques d'adhésion. Le domaine immunoglobuline est également impliqué dans l'adhésion cellule-cellule (Brümmendorf & Lemmon 2001; Aricescu & Jones 2007; Kulin et al. 2002; Springer & Wang 2004).

b. Ce que l'on sait de la structure d'Izumo1

Izumo est une glycoprotéine transmembranaire de 397 acides aminés, très conservée (Grayson & Civetta 2012). Elle a un domaine extracellulaire de 320 acides aminés qui comprend un peptide signal en N-Terminal, un unique domaine immunoglobuline de 145 acides aminés comprenant 8 résidus cystéines hautement conservés qui permettraient la formation d'un unique pont disulfure sur lequel un site de N-Glycosylation est positionné en 204 (Figure 11). La présence de ces motifs cystéines laisse supposer la formation de 4 hélices α dans sa structure secondaire. Izumo1 est par ailleurs capable de former des homodimères dans cette région (Ellerman et al. 2009; Inoue et al. 2005; Kim et al. 2013).

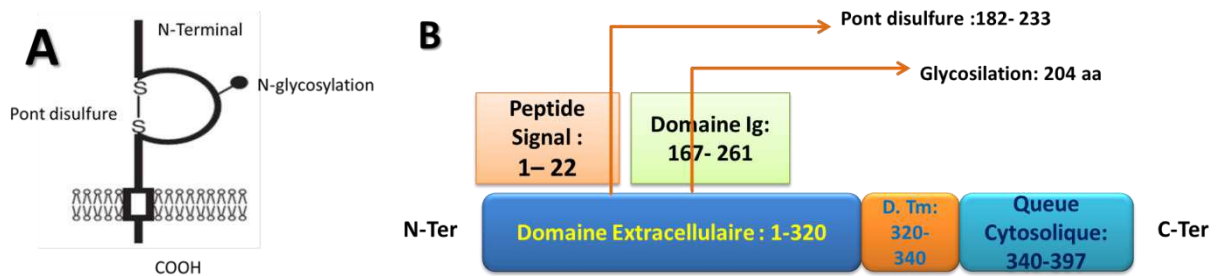


Figure 11 : A/ Dessin schématique d'Izumo tel que décrit par l'équipe d'Okabe. Izumo1 est une protéine transmembranaire ayant un peptide signal (permettant l'adressage de la protéine à la membrane) en N-Terminal, un domaine immunoglobuline comprenant un pont disulfure et un site de N-Glycosylation. La queue cytosolique est courte. Adapté de (Inoue et al. 2005).

B/ Schéma de la structure primaire d'Izumo1 : glycoprotéine transmembranaire de 397 acides aminés. Le domaine extracellulaire comprend un peptide signal en N-Terminal, un site immunoglobuline conservé comprenant un unique pont disulfure sur lequel le site de N-Glycosylation est positionné en 204, un domaine transmembranaire court de 40 acides aminés et une queue cytosolique (57 acides aminés) portant les sites de phosphorylation.

c. La famille Izumo

L'équipe Américaine de Myles et Primakoff s'est également intéressée à la protéine Izumo1. Elle a identifié trois nouvelles protéines ayant une grande homotypie avec le domaine N-terminal d'Izumo1. Elle les a appelé Izumo2, Izumo3 et Izumo4 (Figure 12).

Izumo1, Izumo2 et Izumo3, présents uniquement dans le testicule et dans le sperme, sont transmembranaires et exprimés au niveau de la membrane acrosomique du spermatozoïde. Izumo 4 est en revanche une protéine soluble probablement exprimée dans la poche acrosomique. La région d'homotypie des membres de cette famille est constituée de 150 acides aminés et a été appelée le domaine Izumo « Izumo Domain », elle est située en N-terminal en amont du domaine immunoglobuline. Des expériences d'immuno-marquage suggèrent que l'expression de l'un des membres ne dépend pas de celle des autres membres. En effet, Izumo 3 et Izumo 4 ont été révélés sur des spermatozoïdes Izumo1 délétés (Ellerman et al. 2009).

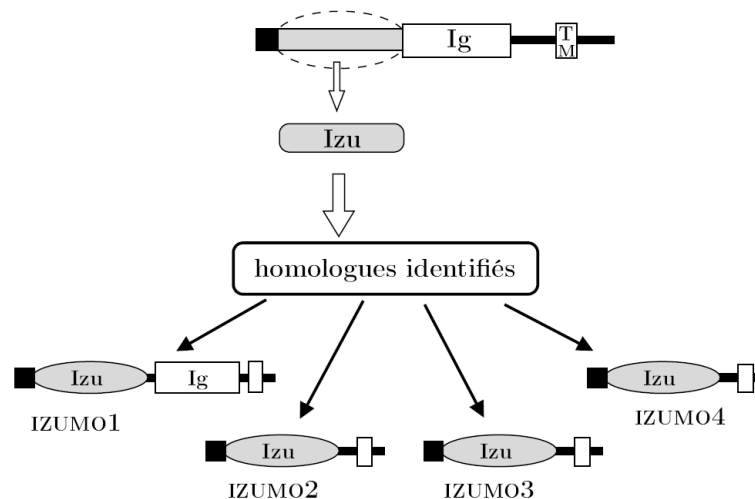


Figure 12: Les membres de la famille Izumo tels que décrits par l'équipe de Myles et Primakoff en 2009. Trois nouveaux membres de la famille Izumo ont été mis en évidence. Ils ont avec Izumo1 un domaine d'homotypie en N-terminal situé en amont du domaine Immunoglobuline. Izumo1, Izumo2, Izumo3 sont retrouvés au niveau de la membrane acrosomique des spermatozoïdes testiculaires. Izumo4 est soluble et est plus largement exprimé. Adapté de (Ellerman et al. 2009).

d. La formation de ponts covalents : le pont disulfure

Izumo1 possède un domaine Immunoglobuline unique très conservé (Kim et al. 2013; Grayson & Civetta 2012). Les expériences de fécondation in-vitro en présence d'anticorps bloquants dirigés contre ce domaine montrent une baisse importante du taux de fécondation (Kim et al. 2013; Wang et al. 2009).

- rôle possible dans l'interaction gamétique

Ces résultats laissent à penser qu'Izumo1 puisse être impliqué dans une adhésion en Trans entre le spermatozoïde et l'ovocyte. Mais à ce jour aucune protéine ovocytaire n'a été décrite comme interagissant avec ce domaine immunoglobuline.

e. La glycosylation

La glycosylation joue un rôle primordial en contrôlant le repliement des protéines et en les protégeant de la protéolyse. Elle consiste en une N-glycosylation (liaison amide à un sucre) ou en une O-glycosylation (liaison osidique à un sucre). La glycosylation intervient dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire, le transport et l'adressage des protéines à la membrane ou vers les vésicules (van Vliet et al. 2003; Helenius 2001). En ce qui concerne IZUMO1, un site unique de N-glycosylation a été retrouvé dans sa portion extracellulaire (Inoue et al. 2008).

- rôle possible dans l'interaction gamétique

Afin de déterminer le rôle de la N-glycosylation dans l'interaction spermatozoïde-ovocyte, l'équipe japonaise d'Okabe a généré une lignée transgénique (N204Q-IZUMO) exprimant une protéine Izumo1 non glycosylée sur un fond infertile de souris Izumo1 $-/-$, ainsi qu'une lignée exprimant Izumo1 glycosylée sur le même fond de souris Izumo1 $-/-$. Elle observe que tant l'expression d'Izumo1 glycosylée que non glycosylée restaure la fertilité des mâles, montrant que la glycosylation n'est pas indispensable au processus de fusion des gamètes. Néanmoins, les taux de fécondation issus de FIV faites avec des spermatozoïdes exprimant la forme non glycosylée d'Izumo1 sont deux fois moins élevés que ceux obtenus avec les spermatozoïdes Izumo1 KO exprimant la forme glycosylée de la protéine. Par ailleurs, l'équipe montre que la quantité de N204Q-Izumo1 produite dans les testicules est comparable à la quantité d'Izumo1 produite par la lignée sauvage, mais qu'au fur et à mesure de la maturation du spermatozoïde dans l'épididyme, la quantité de N204Q-Izumo1 diminue fortement par rapport à celle d'Izumo1 glycosylée. Ils en concluent que la N-glycosylation joue plutôt un rôle en assurant la stabilité de la protéine lors de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme en la protégeant probablement de la protéolyse par les protéases acrosomique (Inoue et al. 2008).

f. La phosphorylation

La phosphorylation intervient notamment dans la transduction des signaux à travers la membrane. Elle est catalysée par différentes protéines kinases spécifiques et est régulée par un système de signalisation hormonal et calcique.

L'équipe de Miles et Primakoff est la première à avoir montré que la phosphorylation a lieu sur Izumo1 et à suggérer son implication dans la relocalisation d'Izumo1 et à la membrane plasmique lors de la réaction acrosomique. Partant de membranes de spermatozoïdes de souris acrosome réagis et acrosome non réagis, ils ont détecté par spectrométrie de masse une protéine de 397 acides aminés (Stein et al. 2006). En générant des anticorps polyclonaux de lapin contre cette protéine, ils mettent en évidence un doublé de 56/60 kD. La migration en présence de phosphatase alcaline ne permet plus de retrouver la bande à 60 kD, alors que la bande à 56 kD devient plus importante. Ils en concluent que cette dernière correspond probablement à la forme non-phosphorylée de la protéine (Figure 13) (Stein et al. 2006; Ellerman et al. 2009). Les recoupements avec les travaux d'Inoue et al. (Inoue et al. 2005) montrent alors que la forme de 56 kD est la forme non phosphorylée et qu'elle n'est exprimée qu'au niveau de la tête des spermatozoïdes acrosome réagi, la forme phosphorylée étant absente après la réaction acrosomique. Afin de mettre en

évidence les sites probables de phosphorylation, ils génèrent des anticorps dirigés contre la partie cytosolique d'Izumo1 : la séquence CDFNSDYSGDKSEATEN (cf. Annexe1) et confirment ainsi qu'Izumo1 est phosphorylée au niveau de sa queue cytosolique (Ellerman et al. 2009).

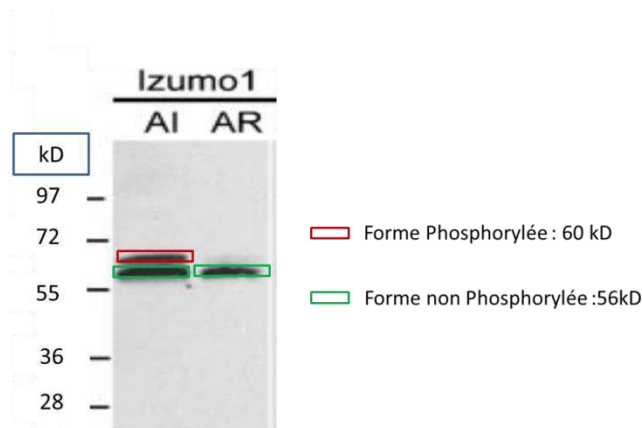


Figure 13: Gel SDS, Izumo1 est révélée par des anticorps polyclonaux de lapin. A gauche le double 56/60 Kd. A droite migration en présence de phosphatase alcaline seule la bande à 56 kD est retrouvée. Adapté de (Ellerman et al. 2009).

Récemment, Baker et al. ont montré que ces phosphorylations se font lors de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme et qu'elle ont toutes lieu sur une très courte portion de la queue cytosolique, les sites de phosphorylation identifiés sont représentés sur la Figure 14 (Baker et al. 2012).

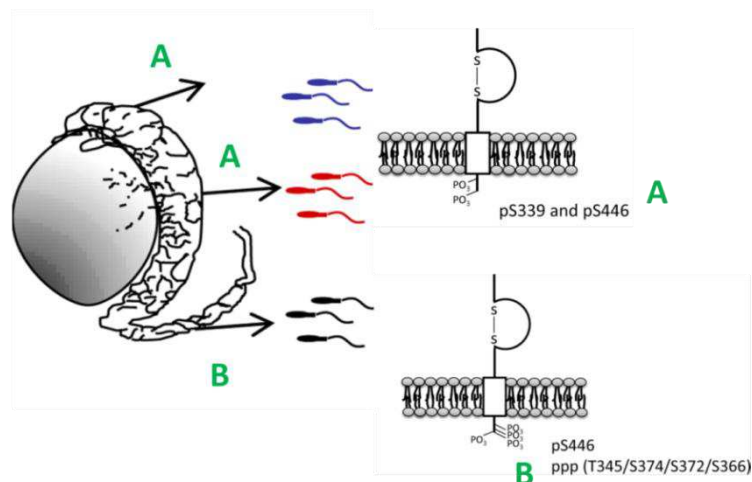


Figure 14: Schéma Indiquant les sites de phosphorylation d'Izumo1 lors des différents stades de maturation du spermatozoïde dans l'épididyme. A/ Tête de l'épididyme. B/ Queue de l'épididyme. Adapté de (Baker et al. 2012)

- rôle possible dans l'interaction gamétique

Cette modification post traductionnelle semble jouer un rôle dans la relocalisation d'Izumo1 mais il n'y a pas de travaux montrant clairement son implication directe dans l'interaction gamétique.

g. La formation de complexes Izumo

L'analyse de lysats de spermatozoïdes et la migration sous conditions dénaturantes ont permis de retrouver la présence de la protéine sous sa forme monomérique mais également sous forme di- tri- et tetra-mériques. En effet, Izumo1 chez la souris peut former des dimères, des trimères et des tétramères. Les dimères ont également été retrouvés chez le rat et chez le porc. Il n'y a pas de travaux rapportant cette analyse chez l'homme.

L'expression d'Izumo1 recombinant tronqué en différentes régions (extracellulaire, transmembranaire ou cytosolique) a montré qu'Izumo1 forme des homodimères dans sa région extracellulaire (Figure 15). Cette dimérisation a lieu en N-terminale, le domaine Immunoglobuline n'étant pas impliqué.

Les tri et quadrimères d'Izumo1 quant à eux vont être formés grâce à leur domaine transmembranaire et/ou cytosolique. Ils ont été observés sur Izumo1 de souris mais également sur l'Izumo1 du porc (Ellerman et al. 2009; Kim et al. 2013).

- rôle possible dans l'interaction gamétique

Le rôle joué par de ces complexes protéiques n'a pas été étudié. Nous pouvons toutefois envisager un effet coopératif qui permettrait d'augmenter le lien entre le spermatozoïde et l'ovocyte lors du processus d'adhésion/fusion.

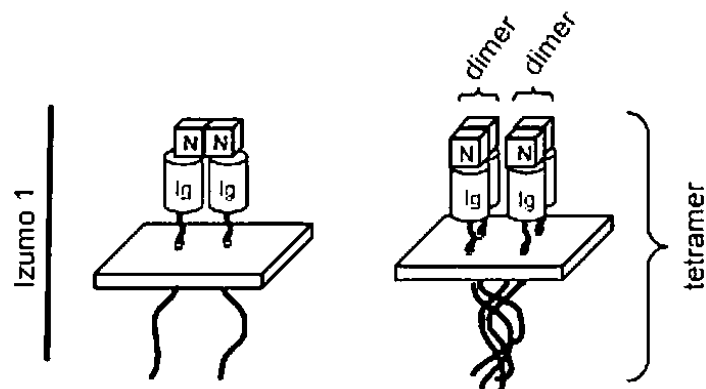


Figure 15: Schéma représentant la formation d'homodimères et d'homomultimères selon (Ellerman et al. 2009).

h. Interaction avec les autres protéines

Aucun des travaux récents basés sur l'approche protéomique utilisant la spectrométrie de masse n'a rapporté la présence de protéines interagissant en trans avec Izumo1. En revanche, sa capacité à interagir en Cis avec d'autres molécules qu'elle-même a été mise en évidence (Ellerman et al, 2009). Izumo1 pourrait organiser des complexes protéiques à la membrane des spermatozoïdes (DRMS : detregent resistant microdomains). Une interaction en Cis a été rapportée. Elle implique la protéine spermatique Angiotensin-converting enzyme 3 (Ace3). Toutefois la génération d'une lignée transgénique portant une délétion de cette protéine ne rapporte pas de stérilité et montre tout au plus une relocalisation d'Izumo légèrement différente de celle de la lignée sauvage (Inoue et al. 2010).

- rôle possible dans l'interaction gamétique

L'interaction avec d'autres protéines de la surface spermatique suggère qu'Izumo1 développe des interactions en Cis avec d'autres protéines qui peuvent être elles-mêmes des protéines d'adhésion ou de fusion. Ce qui n'exclut pas la possibilité d'une action en Trans également.

3. Izumo1 est une protéine spécifique de la tête du spermatozoïde ayant des propriétés de relocalisation et de diffusion

a. Izumo1 est une protéine de la tête spermatique

En utilisant une lignée de souris transgénique exprimant une étiquette EGFP sur l'acrosine, l'équipe d'Okabe constate qu'Izumo1 n'est présent sur la membrane plasmique du spermatozoïde qu'une fois qu'il a fait sa réaction acrosomique. Cette protéine est exclusivement localisée sur la tête du spermatozoïde (Inoue et al. 2005). L'équipe de Myles et Primakoff le confirme en analysant séparément les têtes et les flagelles des spermatozoïdes (Ellerman et al. 2009).

b. Izumo1 est une protéine qui se relocalise au moment de la réaction acrosomique

En générant une lignée de souris transgénique exprimant Izumo1 portant une étiquette mCherry, l'équipe d'Okabe apporte un nouvel éclairage quant à la distribution d'Izumo dans le spermatozoïde (Satouh et al. 2012). En effet, elle montre que cette protéine est en fait localisée sur les membranes acrosomales interne et externe (Figure 16 A) (donc protégée de l'environnement extérieur) jusqu'à l'accomplissement de la réaction acrosomique. Au cours de cette réaction Izumo1 subit une relocalisation sur la membrane plasmique où elle devient donc exposée à l'environnement.

Izumo1 se répand alors sur l'ensemble de la tête et montre une tendance à se rassembler au niveau de la zone équatoriale (Satouh et al. 2012) (Figure 16 B).

La relocalisation d'Izumo1 est associée à une sérine kinase spécifique du testicule (*TssK6*). La génération d'une lignée de souris transgénique délétée de cette kinase montre qu'elle est nécessaire à la relocalisation d'Izumo1 au moment de la réaction acrosomique. Les spermatozoïdes issus de cette lignée ne peuvent féconder et ce probablement en rapport avec ce défaut de relocalisation (Sosnik et al., 2009).

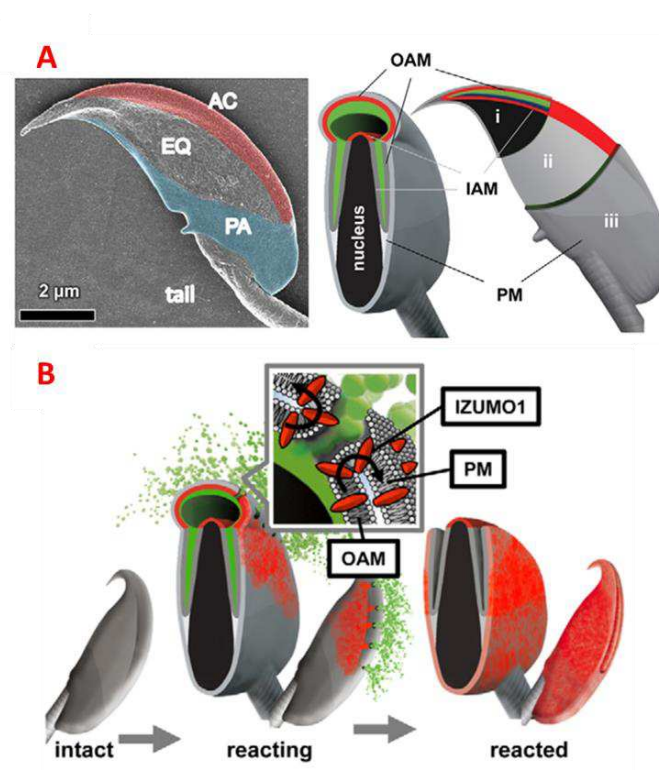


Figure 16: A/Schéma d'un Spermatozoïde Izumo1-mCherry. A gauche la tête du spermatozoïde avec les trois régions : AC (région acrosomique) ; EQ (zone équatoriale) ; PA (région postacrosomale). IAM (membrane acrosomique interne); OAM (membrane acrosomique externe); PM (membrane plasmique). Izumo1 mCherry est localisé uniquement au niveau des membranes acrosomales interne et externe. B/Schéma des étapes de relocalisation d'Izumo1 au cours de et après la réaction acrosomique. Au moment de la réaction acrosomique, les membranes acrosomique externe et plasmique vont fusionner, Izumo1 se relocalise au niveau de la membrane plasmique. Cette relocalisation concerne toute la tête du spermatozoïde, mais Izumo1 se relocalise préférentiellement au niveau de la région équatoriale. (Satouh et al. 2012).

c. Izumo1 est une protéine qui se relocalise vers l'ovocyte ?

Comme précisé précédemment, les images de microscopie électronique ont montré que les spermatozoïdes débutent le processus de fusion avec la membrane plasmique de l'ovocyte au niveau de la zone équatoriale. L'équipe d'Okabe a suivi la dynamique de relocalisation d'Izumo1 grâce aux spermatozoïdes de la lignée Izumo1-mCherry lors d'expériences de fécondation in-vitro avec des ovocytes dépellucidés a observé la relocalisation d'Izumo1 au niveau de la membrane de l'ovocyte puis une diffusion d'Izumo1 à partir de la zone de contact dans la membrane ovocytaire (Figure 17). En observant le film présenté par l'équipe, nous ne pouvons tirer les mêmes conclusions, il semble au contraire qu'Izumo1 reste fixées en patches au niveau de la zone où l'adhésion a eu lieu. Le film décrivant ce processus est disponible dans la référence suivante (Satouh et al. 2012).

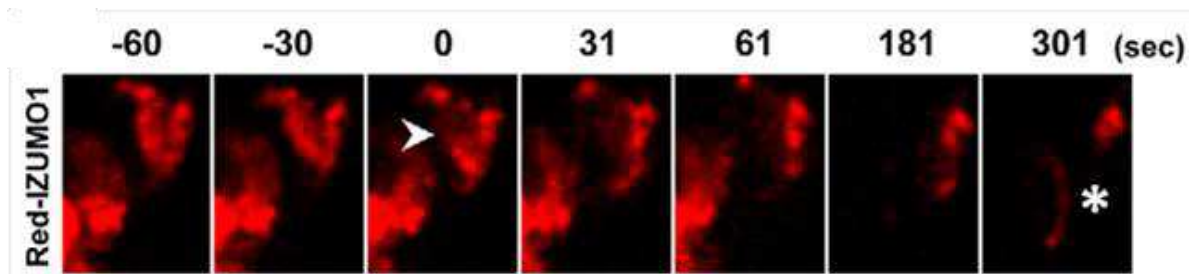


Figure 17: Spermatozoïde Izumo1-mCherry fécondant un ovocyte dépellucidé. Imagerie Confocale. Temps 0 sec : initiation de la fusion. Au temps 301 sec l'* indique la diffusion d'izumo1 au moment de la fusion (Satouh et al. 2012).

d. Izumo1 une protéine de fusion ?

Des fécondations in-vitro ont également été menées par la même équipe avec des ovocytes portant une étiquette EGFP sur le CD9 (Miyado et al. 2008). En visualisant à la fois la membrane cytoplasmique de l'ovocyte grâce à CD9-EGFP et celle du spermatozoïde grâce à Izumo1-mCherry, la présence de vésicules d'internalisation formées par la membrane ovocytaire englobant la membrane spermatique est révélée. Izumo1 disparaît de ces vésicules 20 min après le début de la fusion (Figure 18) (Satouh et al. 2012). La présence d'Izumo1 au niveau de la zone de fusion et au niveau des vésicules d'internalisation a permis à Okabe et al. de conclure quant à son implication dans le processus de fusion.

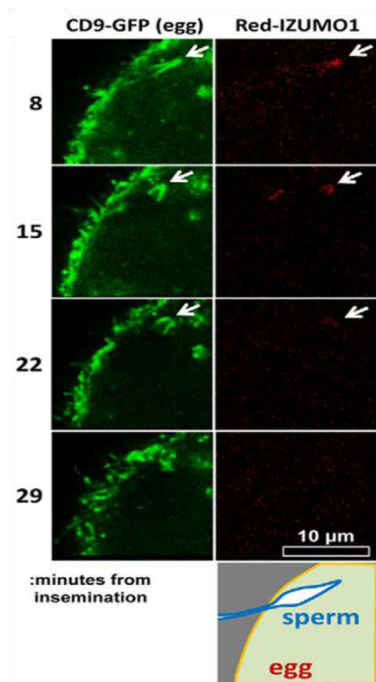


Figure 18: Spermatozoïde Izumo1-mCherry fécondant un ovocytecd9-GFP dépellucidé. Imagerie Confocale. Les flèches indiquent Izumo1 au niveau de la vésicule d'internalisation. A 29 min Izumo1 a disparu (Satouh et al. 2012).

4. Conclusion

Izumo1 est une protéine clé de l'interaction gamétique. Son rôle en tant que protéine d'adhésion ou protéine de fusion ou régulateur d'autres protéines de fusion est encore à déterminer. Elle ne dispose a priori pas de motif de fusion mais possède une structure de type immunoglobuline qui suggère la possibilité d'une liaison en Trans avec un partenaire ovocytaire. Une telle éventualité a souvent été évoquée mais à ce jour aucune protéine de la membrane ovocytaire n'a été décrite comme telle. Il est par ailleurs reconnu qu'Izumo1 développe des liaisons en Cis avec d'autres protéines et est impliquée dans des complexes protéiques. On sait également qu'Izumo1 se relocalise au moment de la réaction acrosomique pour recouvrir toute la tête du spermatozoïde avec une plus forte concentration au niveau de la zone équatoriale. Or le spermatozoïde aborde l'ovocyte par cette région de la tête au moment de l'adhésion. Cette concentration au niveau de la zone équatoriale semble critique pour le bon fonctionnement du processus de fusion.

5. Schéma récapitulatif des principaux acteurs protéiques (Figure 19)

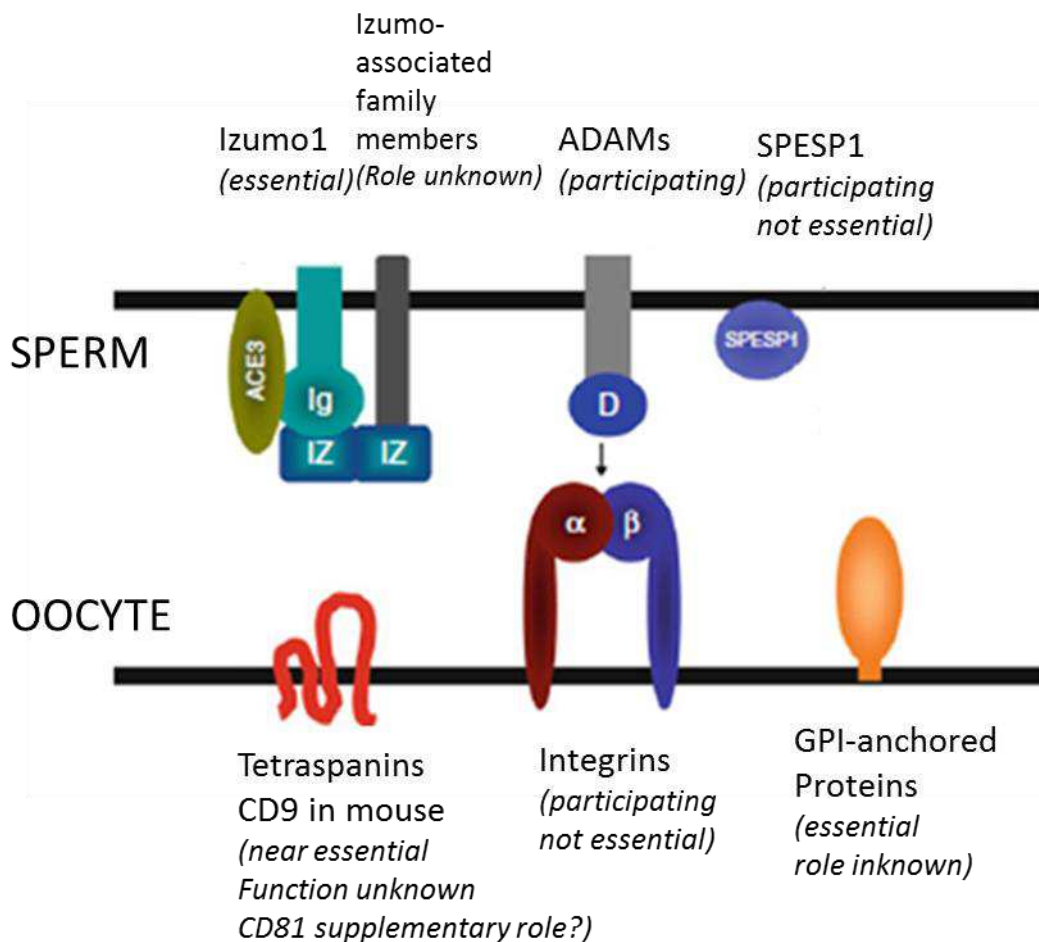


Figure 19: Schéma récapitulatif représentant les principaux acteurs impliqués dans les processus d'adhésion/fusion gamétique. Adapté de (Gadella & Evans 2011).

I. Sur le spermatozoïde

1. **Izumo1** : Seule protéine de la membrane spermatique dont l'absence entraîne une stérilité totale. A un domaine Immunoglobuline qui joue un rôle important dans le processus de fécondation. Elle développe des interactions en Cis avec d'autres protéines telles que l'ACE3. Elle développe également des complexes dimériques et multimériques qui pourraient jouer un rôle en renforçant l'adhésion. Son rôle en tant que fusogène, d'organisateur de fusogène ou de protéine d'adhésion est encore à éclaircir.
2. **Les protéines de la famille ADAM** : ADAM1 et ADAM2 développent des liaisons en trans avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ ovocytaire. La génération de lignées transgéniques montre un défaut de stérilité mais pas de stérilité totale.

SPESP1 (Sperm Equatorial Segment Protein) : Exprimée au niveau de la zone équatoriale du spermatozoïde et colocalise avec Izumo1. Les spermatozoïdes issus de la lignée KO pour cette protéine montrent un défaut de fusion.

II. Sur l'ovocyte

- 1. La tétraspanine CD9 est une protéine cruciale de l'interaction gamétique. Son absence entraîne une baisse importante de la fertilité. Les spermatozoïdes sauvages adhèrent à l'ovocyte CD9 KO mais ne peuvent fusionner. Trois scénarios ont été proposés : 1/Une action en CIS en interagissant avec d'autres protéines de la membrane ovocytaire. Elle serait à l'origine de plateformes d'adhésion permettant d'induire la fusion ; Les principaux partenaires rapportés sont les intégrines et les protéines de la superfamille des immunoglobulines. 2/Une action en Trans : CD9 pourrait constituer un récepteur d'une protéine spermatique, Izumo1 est une des protéines candidates. 3/ Une régulation de la structure des microvillosités.*
- 2. Les intégrines : protéines récepteurs des ADAMs et partenaires des tétraspanines. Sont également présentes à la surface des spermatozoïdes. L'invalidation des gènes pour ces protéines ne montrent pas d'infertilité.*
- 3. Les GPI-Anchored Protein (GPI-APS), ou ancres membranaires. Elles sont impliquées dans les processus de fusion. Les spermatozoïdes féconds des ovocytes délétés pour le gène s'accumulent dans l'espace périvitellin sans fusionner.*

Questions posées et objectifs

Izumo1 est une protéine clé de l'interaction gamétique ; son rôle en tant que protéine d'adhésion interagissant en Trans n'a pas été démontré. Seules des interactions en Cis ont été décrites, et à ce jour aucun partenaire ovocytaire n'a été identifié. L'objectif de mon travail de thèse a été d'explorer le mode d'action d'Izumo1 dans l'interaction gamétique, notamment en tant que protéine d'adhésion.

Pour cela, nous avons combiné les approches de biologie moléculaire, de biochimie et adapté deux techniques issues de la biophysique: le Biomembrane Force Probe et la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules pour répondre à deux questions

1. Quelle est la fonction de la protéine dans l'interaction gamétique à l'échelle cellulaire ?
2. Quelle est la fonction jouée par le domaine extracellulaire (ECD-Iz) et ce à l'échelle de la molécule unique ?

Ce travail a été mené en étroite collaboration avec deux équipes de biologistes, de biochimistes et de médecins du Laboratoire de Biologie de la Reproduction Humaine de l'hôpital Cochin à Paris, dirigée par le professeur Jean-Philippe Wolf, et de l'unité Réponses Cellulaires au Microenvironnement et Cancer Université Paris-Sud, dirigée par le professeur Claude Boucheix.

2ème Partie/ matériels et méthodes

Chapitre 1/ La préparation des gamètes

Les gamètes sont des cellules dont la fenêtre d'utilisation est courte (environ 12 heures) ; elles ne peuvent, de ce fait, être cultivées. Nous avons eu recours à la souris comme modèle d'étude de fécondation chez les mammifères car il s'agit d'un petit animal dont l'élevage est facile et la manipulation simple. Ses cycles de reproduction sont relativement courts ce qui permet d'adapter facilement les rythmes des accouplements aux besoins des expériences.

Toutes les lignées que nous avons utilisées, sauvages et transgéniques, sont issues du même fond génétique, ce qui a permis à la fois la reproductibilité et la comparabilité des données. Par ailleurs, la souris supporte très bien la consanguinité, ce qui nous a permis de mener des accouplements au sein de notre groupe d'animaux transgéniques.

1. Les lignées de souris

Toutes les souris sauvages et transgéniques sont maintenues à l'animalerie centrale de l'ENS-Biologie. Cette animalerie est de type EOPS pour Exempt d'Organisme Pathogène spécifique. Ceci signifie que tous les animaux sont indemnes d'agents pathogènes spécifiques (selon la liste de référence utilisée en France, à savoir la liste proposée par la Federation of European Laboratory Science Associations (FELASA), mais peuvent être porteurs d'agents opportunistes.

a. La lignée « sauvage »

Les souris sauvages C57BL6/J sont achetées au fur et à mesure des besoins au laboratoire Charles Rivers Laboratories (France). Le choix de la lignée C57BL6/J pour les souris sauvages a été dicté par le fond génétique des souris transgéniques utilisées tout au long de cette thèse, toutes de type C57BL6. Ce fond génétique commun permet une comparaison directe et fiable de l'ensemble de nos résultats. A leur arrivée à l'Animalerie Centrale de L'ENS Biologie, les souris sont âgées de 3 ou 5 semaines. Un délai d'une semaine est respecté avant utilisation afin que les souris puissent s'acclimater à leur nouvel environnement et que le stress du transport et du changement d'environnement n'entrave pas la production des gamètes.

b. Les lignées transgéniques : le géotypage, la décontamination, le transfert et la réactivation de lignées

Trois lignées transgéniques ont été nécessaires à la réalisation de ce travail. Ces lignées transgéniques sont maintenues en élevage à l'animalerie centrale de l'ENS-Biologie (élevage sans enrichissement). Ce sont toutes des lignées consanguines établies sur un fond C57BL6/J. Pour les

besoins de ma thèse, j'ai eu la prise en charge de la gestion des élevages de ces lignées: les accouplements, les génotypages ainsi que les sacrifices des animaux.

i. La lignée CD9 KO

La lignée CD9 KO a été obtenue par inactivation génique par recombinaison homologue de la séquence codant pour le CD9. La lignée est issue de souris *mus musculus* de type C57BL/J. La lignée a été déposée sous la dénomination "CD9 KO" par Claude Boucheix de l'Unité mixte INSERM U602 "Réponses Cellulaires au Microenvironnement et Cancer" de l'hôpital Paul Brousse à Villejuif. Les femelles de la lignée CD9 KO ont un taux de fertilité extrêmement bas (Miyado 2000; Le Naour et al. 2000; Kaji et al. 2000). Les femelles homozygotes pour la mutation (les femelles CD9 $-/-$) sont presque infertiles contrairement aux mâles portant le même génotype qui ont une fertilité normale. Les femelles hétérozygotes pour la mutation (les femelles CD9 $+/-$) sont également fertiles. Aussi, dans le respect des bonnes pratiques et pour une gestion raisonnée des élevages, nous avons procédé à des accouplements entre les femelles CD9 $+/-$ et les mâles CD9 $-/-$. Ceci nous a permis d'obtenir des portées statistiquement composées de 50% de souris CD9 $+/-$ et de 50% de souris CD9 $-/-$. Bien entendu, chaque souris naissante était donc à génotyper. Le protocole est détaillé dans l'annexe 4. Les femelles CD9 $-/-$ ont servis aux expériences. Selon les besoins, les autres souris ont servi aux expériences contrôles, aux accouplements suivants, ou encore ont été sacrifiées.

ii. La lignée Acr-EGFP

Cette lignée nous a été gracieusement donnée par M. Okabe de l'Université d'Osaka (Okabe et al. 1997; Nakanishi et al. 2001). Les souris de cette lignée portent un transgène faisant exprimer une étiquette EGFP à l'acrosine. Cette particularité permet de discriminer, au moment de l'expérience, les spermatozoïdes qui ont fait leur réaction acrosomique (absence de fluorescence) de ceux qui ne l'ont pas faite (acrosine fluorescente). Les souris de cette lignée sont également porteuses d'un transgène Actine-EGFP. Le fond génétique de ces souris est le C57BL6/J.

A son arrivée du Japon cette lignée devait être décontaminée, elle a donc été hébergée à l'animalerie conventionnelle. Avant de pouvoir être transférées à l'animalerie dite « propre », les souris devaient être accouplées et les embryons implantés chez des femelles « receveuses » possédant un statut sanitaire conforme à celui de l'animalerie EOPS.

Nous avons rencontré un problème avec cette lignée. Les femelles souffraient d'une malformation utérine commune à ce fond génétique (une cloison utérine). Elles décédaient avant d'avoir pu mettre bas. Au final, nous n'avons ainsi pu récupérer qu'un seul mâle et sommes finalement parvenus à rétablir la lignée grâce à des accouplements avec des femelles sauvages. D'homozygote, la lignée est alors passée à hétérozygote. Nous avons donc dû établir un protocole de

génotypage (présenté en annexe 4) afin de pouvoir discriminer les descendants portant la mutation voulue de ceux ne la portant pas. Après plusieurs générations, nous avons pu recréer la lignée homozygote. Elle est maintenant bien établie et permet de réaliser les accouplements entre souris portant toute la mutation ce qui permet de ne plus avoir à se préoccuper du génotypage des souris pour cette lignée.

iii. La lignée CD9-EGFP

Cette lignée a été obtenue par l'équipe de Miyado en 2008. Les souris de cette lignée expriment une étiquette EGFP sur le CD9 ovocytaire uniquement (Miyado et al. 2008). Cette lignée a d'abord été hébergée à l'animalerie conventionnelle de Cochin où elle a été contaminée par le virus de Theiler (TMEV Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus) et le virus de l'hépatite murin (le MHV). Les femelles de cette lignée généraient très peu de petits et avaient des troubles du comportement de type cannibalisme.

Pour pouvoir transférer ces souris dans notre animalerie, nous avons fait une première tentative de décontamination au CDTA d'Orléans. Pour cette décontamination, nous n'avions que des mâles à l'âge requis. Nous devions donc passer par des accouplements avec des femelles « sauvages » du même fond génétique. Or cette lignée étant maintenue en élevage à l'état homozygote et il n'y avait pas de protocole de génotypage pour cette lignée. J'ai été amenée à mettre au point le protocole de génotypage, celui-ci est détaillé dans l'Annexe 4. La première décontamination a échoué, nous avons alors procédé à la seconde décontamination qui a été effectuée par les laboratoires Charles Rivers Laboratories (France). Pour cette deuxième décontamination, nous n'avons de nouveau pu fournir que des mâles qui ont été accouplés avec des femelles « sauvages ». Chaque tentative de décontamination et établissement d'une lignée stable nécessite de 6 à 9 mois, repoussant d'autant la possibilité d'expérimenter avec ces animaux. Les descendants de ces accouplements viennent d'être introduits à l'animalerie centrale de l'ENS-Biologie, la gestion de la lignée est maintenant reprise par Benjamin Ravaux en première année de thèse sur la thématique de la fécondation également.

2. Le conditionnement des gamètes

Notre étude consistant à caractériser l'interaction entre la membrane plasmique de l'ovocyte et le spermatozoïde, nous avons travaillé avec des ovocytes dépellucidés (ovocytes dont nous avons retiré la zone pellucide) et des spermatozoïdes sur lesquels nous avons induit la réaction acrosomique. Pour les besoins de chaque expérience, nous avons eu recours au sacrifice de l'animal afin de prélever les gamètes.

a. Obtention des ovocytes dépellucidés

La souris est un rongeur nocturne. Elle ovule spontanément tous les 4 à 5 jours et ce 3 à 5 heures après le début de la période de nuit. Pour synchroniser les ovulations et obtenir le maximum d'ovocytes, on doit procéder à une super-ovulation. Les femelles âgées de 6 à 8 semaines sont injectées en intrapéritonéale avec 5 unités de PMSG ou gonadotrophine sérique (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Folligon, Intervet, France), suivies par 5 unités de HCG ou gonadotrophine chorionique (human chorionic gonadotropin Chorulon, Intervet, France) 48 heures plus tard. La PMSG va accélérer la maturation de plusieurs follicules ovariens, la HCG va permettre leur éjection des trompes et la reprise de la maturation des ovocytes. 13 heures après la seconde injection, les souris femelles sont sacrifiées par dislocation cervicale. L'abord se fait par incision en forme de V de la peau et du péritoine au niveau de la partie inférieure de l'abdomen en regard de l'appareil génital, puis extériorisation du contenu abdominal et dégagement des trompes. Les ampoules sont prélevées et mises dans une goutte de milieu. Sous la loupe, les ampoules sont dilacérées et les cumulus sont expulsés sous pression.

Les cumulus sont incubés pendant une minute dans une goutte de Hyaluronidase IV-S (Sigma-Aldrich) à la concentration de 15 mg/ml à 37°C. La hyaluronidase est une enzyme qui va dégrader l'acide hyaluronique et libérer l'ovocyte des cellules du cumulus. Les ovocytes sont ensuite rincés trois fois dans du Fertilcult IVF (Fertipro, JCD Laboratories, France) supplémenté à 3% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich) et ce pour éviter que ces ovocytes ne collent au fond de la boîte.

Les ovocytes sont ensuite triés. Seuls les ovocytes II, c'est-à-dire ceux ayant éjecté leur 1er globule polaire, sont gardés et les ovocytes dysmorphiques ou immatures sont éliminés. Le tri se fait sur plaque chauffée à 37°C.

La zone pellucide est dissoute par action chimique lors d'une incubation de moins de 30 secondes dans une solution pure de thyrode acide (Sigma-Aldrich) à température ambiante, puis rincés trois à cinq fois dans du Fertilcult IVF à 3% de BSA. Les ovocytes sont ensuite mis au repos trois heures dans du Fertilcult IVF à 3% de BSA à 37°C sous 5% de CO₂ dans l'incubateur. A l'issue de cette période de repos, un nouveau tri est effectué.

b. Obtention des spermatozoïdes

Les mâles de 8 à 10 semaines sont isolés une semaine environ avant l'expérience. Cet isolement a pour effet de favoriser la production de spermatozoïdes. Le sacrifice de l'animal se fait par élongation cervicale. L'abord se fait par incision en forme de V de la peau et du péritoine au

niveau de l'abdomen, extériorisation du contenu abdominal. Les testicules ayant une position extra-abdominale doivent être remontés en tirant la graisse qui les recouvre. Les épидидymes sont dégagés des vaisseaux, la graisse est disséquée et ils sont prélevés.

Les spermatozoïdes sont éjectés par pression à l'aide de deux pointes sur l'épididyme. Les spermatozoïdes ainsi dégagés sont maintenus dans une goutte de 500 µl Fertilcult IVF à 3% de BSA sous huile Medicult à 37°C sous 5% de CO₂ dans l'incubateur pendant deux heures. La présence de BSA va induire la réaction acrosomique des spermatozoïdes.

Dans certains cas, nous avons eu besoin d'avoir recours à un ionophore A23187 à 10 µM afin d'induire cette réaction acrosomique de manière plus rapide et massive. La sélection des spermatozoïdes "motiles" s'effectue par la méthode du "swim-up" qui consiste à centrifuger les spermatozoïdes à 200 g pendant 2 minutes puis à récupérer 30 min plus tard le surnageant contenant les spermatozoïdes les plus motiles.

c. Les fécondations in-vitro (FIV) de contrôle

Durant ces 3 années de thèse, nous avons mené des expériences sur les gamètes dans conditions expérimentales variées. Afin de s'assurer du bien-fondé des résultats obtenus, il était primordial de vérifier que dans ces mêmes conditions expérimentales, les ovocytes pouvaient être fécondés par les spermatozoïdes. Nous avons par conséquent mené des expériences de fécondation in-vitro en parallèle de chaque nouvelle expérience. Pour cela nous avons repris le protocole de fécondation in-vitro décrit par l'équipe d'Okabe et nous l'avons adapté (Inoue & Okabe 2008). Les spermatozoïdes et les ovocytes étaient préparés tel que décrit précédemment. Les ovocytes étaient préincubés dans une goutte de 500µl à 1/1000ème de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) dans du Fertilcult IVF à 3% de BSA sous huile Medicult à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 15 minutes. Les ovocytes sont rincés trois fois et transférés dans la goutte de fécondation. Le Hoechst 33342 étant un intercalant de l'ADN (Bisbenzimidazole), les ovocytes incubés avec ce marqueur voient leur noyau marqué en bleu sous éclairage ultraviolet (excitation à 350 nm) et leur cytoplasme se saturer de ce marqueur (figure 20).

La fécondation se fait dans une goutte de 100µl de Fertilcult IVF à 3% de BSA sous huile Medicult à 37°C sous 5% de CO₂ : les ovocytes préincubés au Hoechst sont mis en présence de spermatozoïdes à la concentration de 10⁵ spermatozoïdes/µl pendant 1 heure trente. Dès qu'une fusion se produit, les contenus cytoplasmiques des deux cellules communiquent, le Hoechst contenu dans le cytoplasme de l'ovocyte passe dans le spermatozoïde dont le noyau se marque aussitôt en

bleu (Figure 20). Les ovocytes sont ensuite rincés. Ce second rinçage a pour but d'éliminer les spermatozoïdes qui n'ont pas adhéré.

L'analyse de l'expérience se fait sous microscope confocal Leica SP5 II : les spermatozoïdes dont le noyau est coloré au Hoechst sont comptés. Nous pouvons également observer la décondensation des noyaux des spermatozoïdes fusionnés. Cette décondensation signe le début de formation du pronucleus.

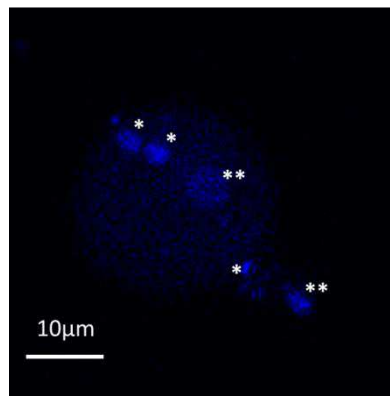
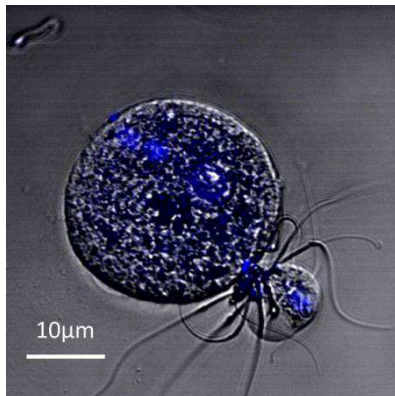


Figure 20 : Ovocyte dépellucidé marqué au Hoechst fécondé par deux spermatozoïdes.

Le Hoechst apparaît en bleu en fluorescence.

** indique les noyaux des deux spermatozoïdes.*

*** le noyau de l'ovocyte et le globule polaire.*

Chapitre 2/ Les cellules eucaryotes

1. Les lignées cellulaires utilisées

a. La lignée cellulaire K562 : lignée en suspension

Les cellules K562 nous ont été données par Lucia Pattarini de l'équipe « Immunité et cancer » de l'Institut Curie (Inserm Unité 932).

La lignée K562, lignée Erythroleucémique humaine, a été décrite en 1975 pour la première fois (Lozzio & Lozzio 1975). Elle provient de cellules de liquide pleural d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique en crise blastique aigue. Ce sont des cellules qui peuvent se différencier en l'une des trois lignées circulantes : érythroïde, mégacaryocytaire ou monocytaire (Sutherland et al., 1986; Tsiftoglou et al., 2003 ; Vainchenker et al., 1981). Ces cellules portent le chromosome « Philadelphie » qui résulte de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Le gène hybride qui en résulte entraîne la synthèse de la protéine Bcr-Abl qui est responsable de la résistance de cette lignée à l'apoptose (Mcgahon et al. 1994).

b. La lignée cellulaire MDA : lignée adhérente

Les cellules MDA nous ont été données par Nathalie Lao de l'équipe « Imagerie de la Machinerie Transcriptionnelle » Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (CNRS UMR8197).

La lignée MDA-MB-231 est une lignée établie à partir d'un épanchement pleural dérivant d'un carcinome mammaire humain, elles ont également un gène de résistance à l'apoptose (Cailleau R et al., 1974).

c. La lignée cellulaire U2OS : lignée adhérente

Les cellules de la lignée U2OS nous ont été données par Adrien Senecal de l'équipe « Imagerie de la Machinerie Transcriptionnelle » Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (CNRS UMR8197).

Les U2OS sont des cellules épithéliales adhérentes issues d'un ostéosarcome humain d'une jeune fille de 15 ans. L'apoptose est inhibée par une protéine virale. Cette variété de cellule a été établie par Ponten et Saksela (Ponten J & Saksela E 1967).

2. Culture, transfection et manipulation de cellules eucaryotes

Les cellules de la lignée K562 sont cultivées en suspension dans du milieu liquide RPMI-1640 (pour Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich) dans des flasques ventilés.

Les cellules des lignées adhérentes MDA et U2OS sont cultivées sur des boîtes de pétri « traitées culture » dans du milieu liquide DMEM (pour Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma Aldrich).

Les milieux ont été supplémentés en antibiotiques (Pénicilline 5U/ml et Streptomycine 50 mg/ml) et par 10% de sérum de veau fœtal.

La conservation des cellules a été faite dans du CryoMaxx SF (PAA Laboratories) à la concentration de 10^6 cellules/ml dans de l'azote liquide.

La viabilité des cellules est vérifiée par le test de coloration au bleu trypan.

Les cellules sont transfectées avec le jetPEI (Polyplus) par transfection transitoire, plusieurs échelles de transfections ont été testées. Le meilleur rendement a été obtenu avec 2 µg de plasmide et 4 µl de jetPEI pour 2.10^5 cellules/ml et a été de 5% environ (le protocole de transfection mis au point est en annexe 3).

Chapitre 3/ Les réactifs pour les expériences

1. Les anticorps utilisés

L'anticorps primaire utilisé pour la révélation des protéines exogènes Izumo1 et Izumo1-EGFP ainsi que la protéine recombinante est l'anticorps monoclonal fabriqué chez le rat dirigé contre Izumo1 murin qui nous a été donné par M. Okabe (Inoue et al. 2005).

Pour révéler la protéine recombinante ECD-Iz1 portant une étiquette myc sur les billes lors des contrôles par cytométrie de flux nous avons utilisé l'anti-myc monoclonal 9E10 (Sigma-Aldrich).

Les anticorps secondaires sont le Goat anti-Rat Alexa-Fluor 488, le Goat anti-Rat Rhodamine et Goat-anti-mouse Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, France).

La révélation de la biotine sur la protéine recombinante ECD-Iz1 biotinylée a été faite à la Streptavidine Alexa-Fluor 700 de (Invitrogen, France).

2. Le marquage des ovocytes

Le marquage membranaire de l'ovocyte a été fait par un fluorophore ayant une queue lipophile qui s'insère dans la membrane plasmique: le PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling, Sigma Aldrich) et le PKH67 (Green Fluorescent Cell Linker Midi Kit for General Cell Membrane Labeling, Sigma Aldrich). Les marquages ont été faits selon les indications du fabricant.

3. L'agent de transfection

Nous avons opté pour une transfection transitoire par un vecteur chimique : le jetPEI (Polyplus). Les vecteurs chimiques sont des molécules naturelles ou synthétiques, lipides ou polymères cationiques, formant des complexes avec l'ADN. Ils ont l'avantage de s'affranchir des problèmes de toxicité rencontrés chez les virus et par l'électroporation.

L'ADN est une macromolécule anionique et les membranes cellulaires sont globalement chargées négativement. Les répulsions électrostatiques limitent donc les contacts entre l'acide nucléique et les membranes plasmiques. Le jetPEI est un polycation linéaire (polyéthylèneimine) synthétique qui forme des complexes avec l'ADN d'intérêt. Ces complexes chargés positivement vont permettre le transfert de l'ADN dans les cellules. Son efficacité semble liée à sa structure chimique. Ses groupements amines sont protonables au pH physiologique. Il emprunterait la voie de l'endocytose et grâce à cette caractéristique, il permettrait l'augmentation de la pression osmotique dans les endosomes entraînant leur rupture et le largage de l'ADN dans le cytoplasme. En passant

vraisemblablement à travers les pores nucléaires (environ 10µm) (Abdallah et al. 1996), l'ADN atteint le noyau.

L'analyse de l'expression de la protéine exogène peut être faite 24h après la transfection. Le plasmide ayant intégré le noyau peut être transcrit sans avoir nécessairement intégré le génome. Toutefois il peut être perdu au cours des divisions cellulaires. En vue d'avoir le meilleur taux de transfection et d'expression de la protéine exogène, les cellules ont été transfectées 24 ou 48h avant chaque expérience.

4. La séquence et les plasmides receveurs

a. La séquence Izumo1 sauvage murin

La séquence codant pour Izumo1 sauvage murin telle que décrite par l'équipe d'Okabe (Inoue et al. 2005) a été fabriquée selon la séquence IZUM1_MOUSE (UniProt Q9D9J7)(Annexe1), sans le codon stop, par Eurogentec et insérée dans un plasmide de clonage pUC57 avec les sites de restriction NheI et XhoI. La séquence portant le codon stop a été obtenue par amplification PCR à l'aide d'AMORCES introduisant le codon stop (Le protocole de sous clonage et de mutagenèse utilisé est en Annexe 5).

b. Le plasmide pCAGGS-RFP (X-301 /pCAGGS-IRES2-tagRFP) : vecteur d'expression

Ce plasmide nous a gracieusement été donné par Xavier Morin de l'équipe mixte "Equipe AVENIR INSERM" "Mitosis and Neurogenesis" de l'institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (INSERM U1024 - CNRS UMR8197). Il a été mis au point au sein de cette équipe et n'a pas encore fait l'objet d'une publication. C'est un plasmide bicistronique (IRES) qui permet l'expression de deux protéines sous promoteur CMV-IE (la carte du plasmide est dans l'annexe2). Il permet d'exprimer la protéine d'intérêt et une protéine senseur d'expression cytoplasmique, en l'occurrence la RFP.

c. Le plasmide pEGFP-N1 : vecteur d'expression

Il s'agit d'un vecteur commercial (Clontech) contenant l'EGFP (Enhanced green fluorescent protein) variant de la GFP (green fluorescent protein) sous contrôle du promoteur CMV-IE. Ce vecteur a été optimisé pour l'imagerie (maximum d'excitation = 488 nm; maximum d'émission = 507 nm) (la carte du plasmide est en annexe2).

5. Les réactifs de clonage et les systèmes de purification

Les enzymes qui ont permis d'établir les constructions proviennent de chez New England BioLabs. Les purifications des produits de migration sur gel et des produits de PCR ont été faites à

l'aide du système de purification NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) selon les indications du fabricant. Les constructions finales ont été obtenues après purification à l'aide du système d'extraction de plasmide NucleoBond Xtra Midi / Midi Plus de (MACHEREY-NAGEL).

6. Les milieux

Le Fertilcult IVF (Fertipro, JCD Laboratories, France) a été utilisé pour la préparation et le repos des gamètes. Lors des expériences, les gamètes étaient maintenues dans du M2 Medium (Sigma Aldrich) contenant de l'HEPES assurant le maintien du pH à 7,4. Dans les deux cas les milieux ont été supplémentés à 3% de BSA (Albumin from bovine serum A2153-500G Sigma Aldrich).

Les expériences d'immuno-marquage ont été faites dans du PBS 1x supplémenté à 1% de BSA.

Chapitre 4 / La micromanipulation par micropipettes

La micromanipulation par micropipettes est adaptée à notre objet d'étude car elle nous permet de manipuler des cellules individuellement, en contrôlant précisément le lieu et temps de contact et éventuellement les forces appliquées en vue de caractériser les interactions qu'elles développent.

1. Les micropipettes

Pour la réalisation de mon travail de thèse, j'ai eu à microforger à partir de capillaires de verre trois types de micropipettes:

- **La micropipette de contention**

C'est la micropipette qui maintient l'ovocyte. Celui-ci est une cellule de $80\mu\text{m}$, la pipette de contention doit donc avoir un diamètre important pour limiter la contrainte exercée tout en ayant une force d'aspiration la plus importante possible. La pipette de contention a donc un diamètre de 35 à $45\mu\text{m}$.

- **La micropipette cellule**

Les cellules que nous avons utilisées comme modèle ont des diamètres autour de $10\mu\text{m}$ et les pipettes cellules ont un diamètre de 4 à $6\mu\text{m}$.

- **La micropipette sonde**

Cette micropipette est utilisée pour les expériences de BFP (Biomembrane Force Probe), technique qui fera l'objet du chapitre deux de la troisième partie de ce travail). Son diamètre est compris entre $1,7$ et $2\mu\text{m}$. Cette taille permet d'aspirer le globule rouge de manière à le déformer et lui conférer une forme sphérique permettant nos mesures. Compte tenu du diamètre $\sim 6\mu\text{m}$ du globule rouge et de sa grande déformabilité, un diamètre plus grand de pipette conduirait à son aspiration dans la pipette.

Les trois pipettes sont reliées à trois réservoirs d'eau. La continuité en liquide entre les réservoirs et le milieu dans lequel l'expérience est menée permet de finement contrôler l'aspiration exercée par les pipettes sur les cellules (à $2,5\text{ Pa}$ près). Avant chaque expérience, l'aspiration dans le système est vérifiée pour ne pas introduire de biais de mesure (Figure 21).

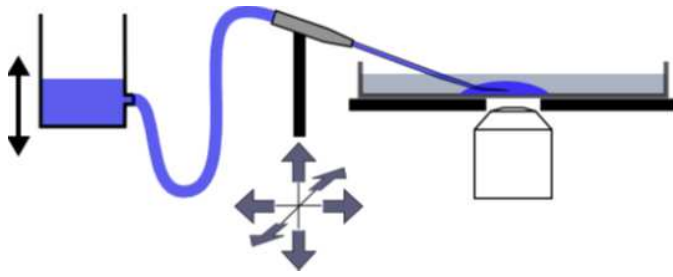


Figure 21: schéma de principe de la micromanipulation. La pipette est préalablement remplie de milieu de culture et reliée à un réservoir d'eau en s'assurant de la continuité en liquide.

2. La fabrication des micropipettes

Les différentes étapes de la fabrication des pipettes sont représentées par la figure 22. Elles sont préparées au laboratoire avant chaque expérience. Les capillaires de verre d'un diamètre interne de 420 μm (Harvard Apparatus, USA) sont tout d'abord étirés à l'aide d'une étireuse P-2000 (Sutter Instruments Co., USA), grâce à un laser qui chauffe le milieu du capillaire et deux ressorts qui tirent simultanément les extrémités des capillaires. Ce passage dans l'étireuse permet d'obtenir deux pipettes identiques dont la pointe est ajustable en fonction du programme que nous introduisons et qui détermine les durées et intensités du chauffage. Les pipettes ainsi obtenues ont une pointe fermée. Les pipettes sont ensuite taillées à un diamètre en fonction de la taille de la cellule micromanipulée. Pour cela, nous utilisons une microforge fabriquée au laboratoire constituée par un fil de platine sur lequel se trouve une petite bille de verre. Le filament est chauffé par un courant électrique jusqu'à ce que la bille de verre rentre en fusion. La pipette est alors introduite dans la bille de verre sous contrôle d'un microscope à faible grossissement, puis le courant est coupé. La pointe de la pipette casse sous la contrainte du verre qui en refroidissant se resolidifie. Pour obtenir une cassure nette de la pipette, l'opération doit être répétée. La pipette étant cette fois ouverte, le verre pénètre par capillarité dans l'extrémité de la pipette et forme une langue. Au refroidissement de la bille de verre, la langue casse et les bords de la pipette sont alors nets. Afin de travailler en boîte de pétri dans une goutte sous huile, les pipettes doivent être coudées. Pour cela nous utilisons une deuxième microforge ayant uniquement un filament de platine. Ce filament est chauffé et la pipette est approchée sous contrôle d'un microscope à faible grossissement. La chaleur fait fondre le verre qui va se plier doucement, dès que l'angle désiré est atteint le courant est coupé.

La pipette de contention est fabriquée uniquement à l'aide de la deuxième forge. Cette pipette a un diamètre important, il n'est pas possible de la casser à l'aide de la première forge. La pipette est mise en contact avec le fil de platine à l'endroit correspondant au diamètre voulu et le courant est coupé. Il est alors possible de la casser. Elle est coudée de la même manière que décrit précédemment et puis rodée (en approchant l'embout de la pipette du fil de platine, le verre fond et n'est plus coupant).

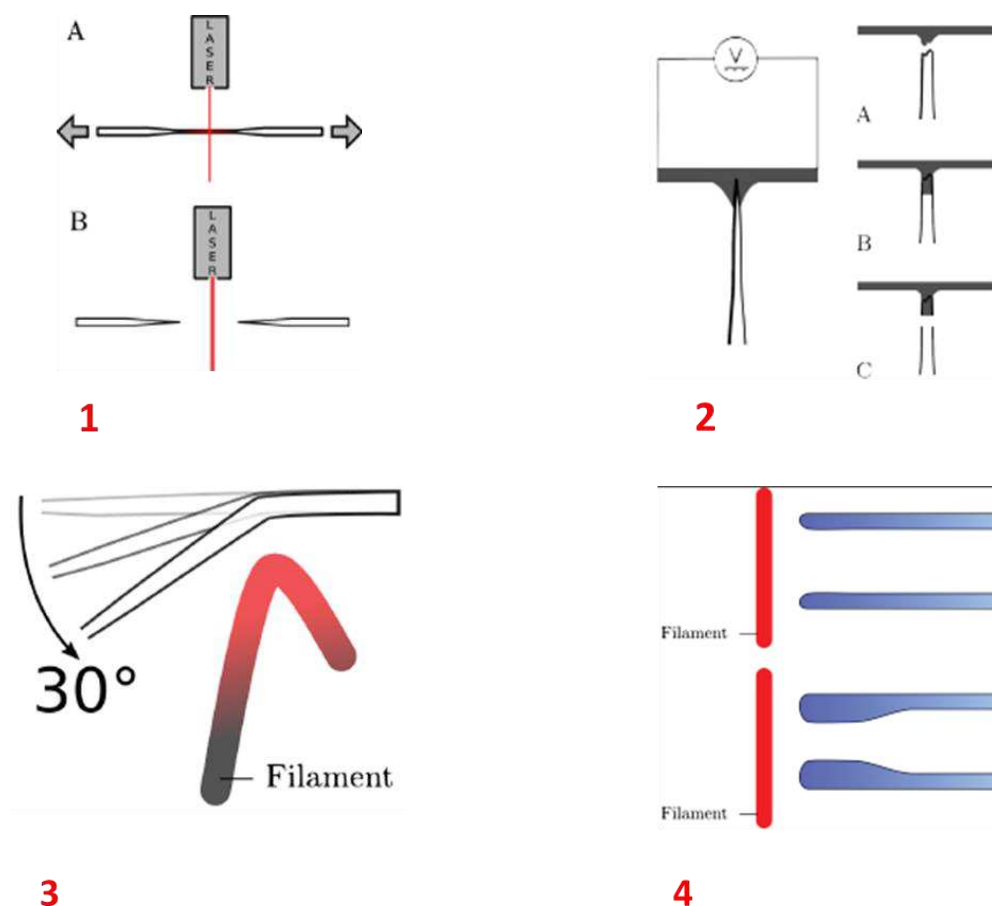


Figure 22: Préparation des pipettes : (1) formation des micropipettes à partir d'un capillaire de verre avec l'étireuse P-2000 Sutter Instrument ; (2) utilisation de la 1ère microforge pour l'ouverture des extrémités des micropipettes ; (3) formation d'un coude d'un angle de 30° par échauffement du filament de la 2nde microforge (4) rodage des pipettes de contention.

3. Le dispositif expérimental

La chambre expérimentale est une boîte de Pétri dans laquelle sont déposées les gouttes de $30\mu\text{l}$ de milieu contenant les objets à tester. Le tout est recouvert par l'huile Medicult. La boîte de Pétri est déposée sur la platine du microscope. Le microscope est contenu dans une enceinte thermostatée transparente et adaptée à la micromanipulation, permettant de travailler à 37°C qui est la température nécessaire à l'intégrité fonctionnelle des gamètes. Les pipettes forgées et coudées telles que décrit précédemment sont préalablement remplies du milieu dans lequel se déroule l'expérience puis passivées dans ce même milieu supplémenté en BSA environ une heure avant le début de chaque expérience et ce, pour éviter que les cellules n'adhèrent aux parois. Le dispositif expérimental est représenté par la figure 23.



Figure 23 : Photo du dispositif expérimental avec deux micropipettes.

Les micropipettes sont maintenues par un support et reliées à des micromanipulateurs. Elles sont placées dans une goutte de milieu au fond de la boîte de Pétri et le tout est recouvert d'huile.

3ème Partie / l'approche cellulaire

Le spermatozoïde entre en contact avec trois composants ovocytaires avant de pouvoir fusionner: les cellules du cumulus, la zone pellucide et la membrane cytoplasmique. Les spermatozoïdes *Izumo1*^{-/-} sont morphologiquement normaux. Ils accomplissent leur réaction acrosomique, traversent toutes les étapes de la fécondation, adhèrent à l'ovocyte mais ne peuvent pas fusionner (Inoue et al. 2005).

Les images de microscopie électronique et les derniers travaux de l'équipe d'Okabe montrent que le spermatozoïde adhère et fusionne avec cette dernière barrière qu'est la membrane plasmique de l'ovocyte par sa zone équatoriale (Satouh et al. 2012). La même équipe a également réussi à montrer qu'Izumo1 se relocalise au moment de la réaction acrosomique au niveau de toute la tête du spermatozoïde et se concentre particulièrement au niveau de cette région équatoriale (Satouh et al. 2012). En l'absence de cette relocalisation, la fécondation ne peut avoir lieu (Sosnik et al. 2009). La présence d'Izumo1 au niveau de cette région de la tête du spermatozoïde au moment de l'adhésion et de la fusion semble donc nécessaire à la réussite de la fécondation.

Izumo1 développe des interactions avec des partenaires en Cis, laissant présager qu'elle est impliquée dans l'organisation de complexes incluant des molécules de fusion (Stein et al. 2006; Ellerman et al. 2009). Parmi ces protéines seule l'Angiotensin-converting enzyme 3 (Ace3) a été identifiée, mais son implication a été écartée car les souris délétées de cette protéine ne sont pas stériles (Inoue et al. 2010).

Ces arguments convergent vers l'hypothèse qu'Izumo1 serait impliquée dans l'étape de fusion en interagissant avec des partenaires de la membrane spermatique. Toutefois, une molécule peut développer une interaction avec un partenaire de la membrane ovocytaire et interagir avec d'autres partenaires spermatiques. L'exemple est donné pour les intégrines qui peuvent avoir à la fois une interaction avec un partenaire en Trans et se lier en Cis à d'autres protéines telle que la tétraspanine CD9 (Berditchevski 2001; Nakamura et al. 2001; Takao et al. 1999).

Nous avons voulu explorer l'hypothèse qu'Izumo1 développe une interaction avec un partenaire ovocytaire (interaction en Trans) outre les liens qu'elle développe avec d'autres protéines de la membrane spermatique (interaction en Cis). Notre stratégie a été de mettre au point un modèle cellulaire qui nous permet d'exprimer la protéine à la surface d'une membrane et de sonder un éventuel lien avec une molécule de la membrane plasmique de l'ovocyte. Pour cela, nous avons généré deux variantes exogènes de la protéine Izumo1 et les avons surexprimées à la membrane de cellules n'interagissant pas ou peu naturellement avec l'ovocyte. Les liens développés entre ces cellules transfectées avec Izumo1 et l'ovocyte ont été analysés au moyen de la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale.

Le premier chapitre de cette 3^{ème} partie sera consacré à la mise au point du modèle d'étude : la recherche de la lignée cellulaire adéquate, le clonage des protéines exogènes et la validation du modèle. La technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale sera exposée dans le second chapitre. Enfin, les résultats obtenus et leur discussion feront l'objet du troisième et dernier chapitre.

Chapitre 1 / La mise au point du modèle d'étude

Afin de mettre en évidence une éventuelle interaction en trans propre à Izumo1 avec un partenaire ovocytaire, le modèle cellulaire choisi devait remplir trois conditions:

1. Ne pas interagir spontanément avec l'ovocyte.
2. Permettre à Izumo1 exogène d'être adressée et exprimée au niveau de la membrane dans les conditions les plus proches des conditions physiologiques.
3. Nous permettre de travailler à l'échelle de la cellule unique.

Nous avons opté pour les lignées de cellules eucaryotes. Elles présentent l'avantage d'être faciles à manipuler, de proliférer de manière rapide et illimitée, de pouvoir être congelées et utilisées en cas de besoin et d'avoir la machinerie de synthèse et d'adressage nécessaire à l'expression des protéines transmembranaires.

1. La recherche de la lignée candidat

La technique de mesure de force par micromanipulation de deux cellules (le principe de cette technique sera développé dans le second chapitre de cette partie) a été utilisée pour sélectionner la lignée cellulaire qui devait nous servir de modèle pour exprimer la protéine exogène. Les cellules étaient mises en contact pendant 5 min avec l'ovocyte puis séparées. Toutes les lignées qui développaient une force d'adhésion avec l'ovocyte supérieure à 1 nN étaient éliminées. Nous avons sondé cinq lignées cellulaires eucaryotes adhérentes (les lignées adhérentes ont la caractéristique de proliférer en adhérant à leur support jusqu'à arriver à confluence), deux lignées eucaryotes en suspension (ces lignées se cultivent en flasques et n'adhèrent pas à leur support), nous avons également testé des cellules primaires (cellules prélevées sur l'animal n'ayant donc pas les caractéristiques de prolifération et d'immortalité mais qui peuvent toutefois permettre l'expression de la protéine d'intérêt quand elles sont transfectées à un stade avancé de leur croissance).

Les résultats obtenus pour chacune de ces lignées sont consignés à la figure 24.

1. lignées de cellules adhérentes : HEK 293, COS-7, CHO, MDA et U2OS. Seule la lignée MDA ne développe pas du tout d'adhésion avec l'ovocyte. La lignée U2OS adhère relativement peu (10% des cas). Quant aux 3 autres lignées, elles adhèrent naturellement trop aux ovocytes pour pouvoir servir à l'étude.
2. lignées de cellules en suspension : K562 et Thp1. Aucune n'adhère spontanément aux ovocytes.
3. Cellules primaires : les astrocytes. Ils adhèrent dans 17% des cas et nous avons préféré les écarter.

Au final, Nous avons retenu les 4 lignées suivantes K562, Thp1, MDA et U2OS.

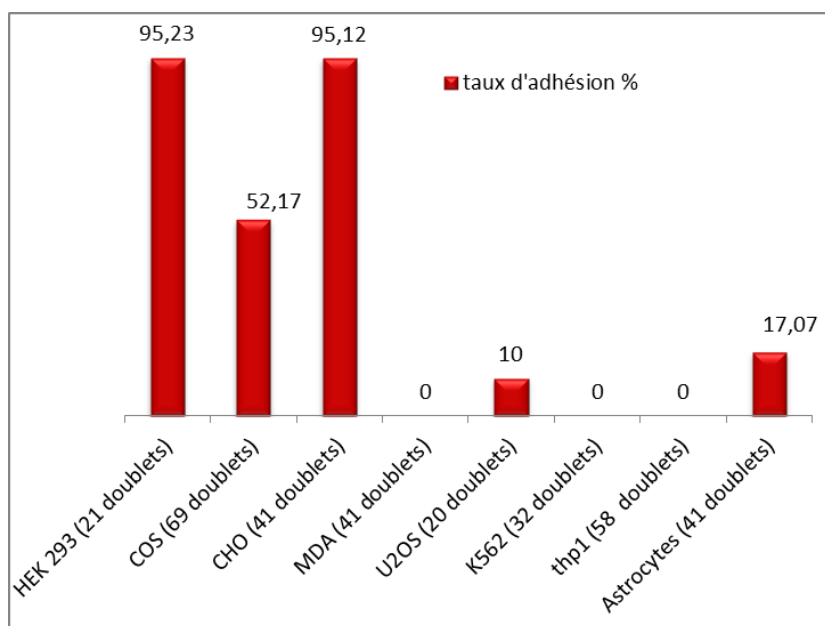


Figure 24 : Le test d'adhésion par micromanipulation entre les ovocytes et différentes lignées cellulaires : les pourcentages d'interaction obtenus pour les tests doublets ovocyte-cellule effectués.

2. La construction des plasmides

Le clonage est une technique de biologie moléculaire qui permet d'isoler la séquence d'ADN d'intérêt dans un plasmide vecteur au moyen d'enzymes de restriction : les endonucléases. Elles coupent l'ADN au niveau d'une séquence particulière et permettent de l'insérer dans une molécule d'ADN bactérien (plasmide vecteur). Dans notre cas, nous avons choisi les sites Nhe1 et Xho1 car ils sont communs aux deux vecteurs d'expression pour lesquels nous avons opté. Le plasmide obtenu est amplifié (c'est-à-dire multiplié de façon identique) dans un système bactérien dit « bactéries compétentes » (bactéries dont la paroi est fragilisée afin de permettre la pénétration des molécules d'ADN) se répliquant grâce aux enzymes propres à la bactérie. Les bactéries compétentes que nous avons utilisées sont des bactéries de la souche Escherichia Coli Top 10 qui ont été transformées par choc thermique et mises en culture afin d'obtenir un grand nombre d'exemplaires des plasmides synthétisés. Les clones obtenus ont été séquencés par la compagnie GATC Biotech.

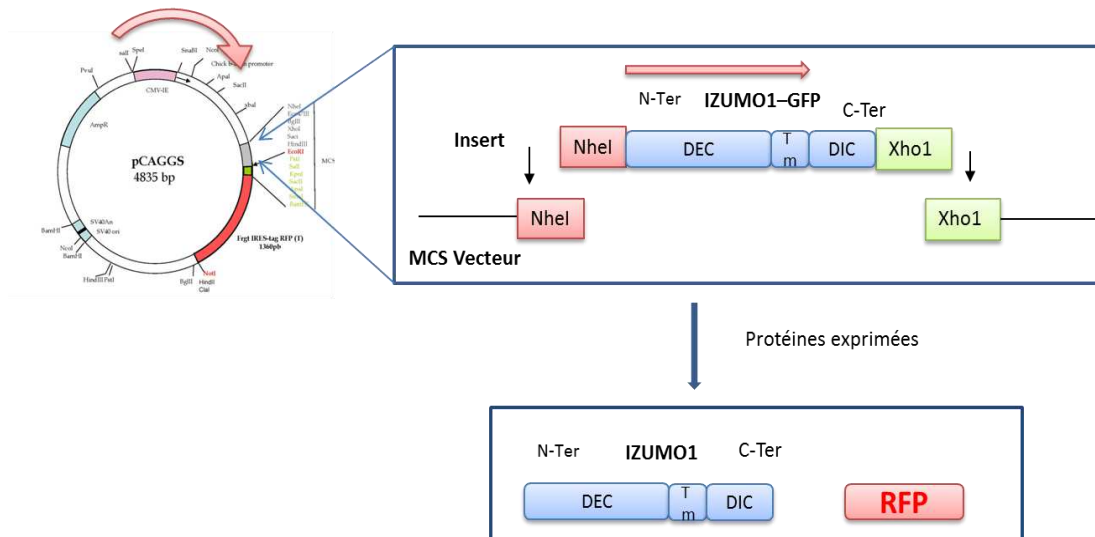
a. Le vecteur pCAGGS-Izumo1-RFP

Izumo1 exogène, exprimée à la membrane cellulaire après transfection (introduction d'un gène dans la cellule pour étudier sa fonction) devait avoir la même structure que la protéine native. Dans nos conditions expérimentales nous travaillons à l'échelle de la cellule unique, or toutes les cellules ayant subi le même protocole de transfection transitoire n'expriment pas forcément la protéine voulue. Une solution pour reconnaître les cellules portant Izumo1 était d'immuno-marquer

la protéine. Cependant, le risque de bloquer avec les anticorps la fonction d'Izumo ou d'induire des interactions non voulues nous a conduit à écarter cette possibilité. La solution que nous avons adoptée a consisté à placer une étiquette fluorescente. La difficulté était de pouvoir placer cette étiquette de manière à ce qu'elle ne gêne pas une fonction de la protéine.

Nous avons donc opté pour un vecteur d'expression bicistronique qui induit l'expression de la protéine d'intérêt ainsi qu'une protéine fluorescente qui fait office de senseur et nous permet de sélectionner les cellules exprimant la protéine exogène et de travailler en cellule unique. Nous avons ainsi effectué des tests de transfections préliminaires, avec des vecteurs vides, afin de déterminer le meilleur rendement pour chacun des plasmides. Nous avons donc opté pour le pCAGGS-RFP.

La séquence codant pour la protéine Izumo1 « sauvage » murine entière a été obtenue par mutagenèse dirigée (le protocole est détaillé en annexe 5) à partir de la séquence sans le codon stop (acides aminés 1 – 396) synthétisée par Eurogentec en utilisant les amorces décrites dans l'Annexe 5. Les produits PCR ont ensuite été sous-clonés dans les sites Nhe1 et Xho1 de pCAGGS-RFP. Le plasmide obtenu a été appelé pCAGGS-Izumo1-RFP et a permis l'expression de la protéine exogène Izumo1 de la souris à la membrane cellulaire et de la protéine fluorescente RFP (Red Fluorescent Protein) cytosolique (Figure 25).



*Figure 25 : La séquence codant pour Izumo1 exogène est obtenue par mutagenèse dirigée à partir de la séquence Q9D9J7 (IZUM1_MOUSE) sans le codon stop acides aminés 1 – 396 et sous clonée dans les sites *Nhe1* et *Xho1* de pCAGGS-RFP. Le vecteur d'expression obtenu pCAGGS-Izumo1-RFP permet d'exprimer la protéine Izumo1 exogène à la membrane cellulaire et la protéine RFP dans le cytosol sous contrôle du même promoteur.*

b. Le vecteur plzumo1-EGFP

Nous avons voulu pouvoir visualiser Izumo1 à la membrane de la cellule au moment du contact avec l'ovocyte (Satouh et al. 2012), nous avons généré une protéine exogène portant une étiquette EGFP. Afin de pouvoir étudier une interaction en Trans de la protéine, donc une interaction mettant en jeu sa partie N-terminale, nous avons fait le choix de placer l'étiquette dans la région cytosolique (C-terminal). Nous avons choisi un vecteur d'expression qui permet de coupler une protéine fluorescente à la position requise : pEGFP-N1 (Clontech). Celui-ci a donné les mêmes rendements de transfection que le plasmide pCAGGS-RFP avec le même agent de transfection.

La même séquence codant pour la protéine Izumo1 sauvage murine sans le codon stop (acides aminés 1 – 396) a été sous clonée dans les sites Nhe1 et Xho1 de pEGFP-N1 (Annexe 5). Le plasmide obtenu permet l'expression de la protéine exogène Izumo1-EGFP, protéine Izumo1 murine portant une étiquette EGFP dans sa partie cytosolique, il a été appelé plzumo1-EGFP (Figure 26).

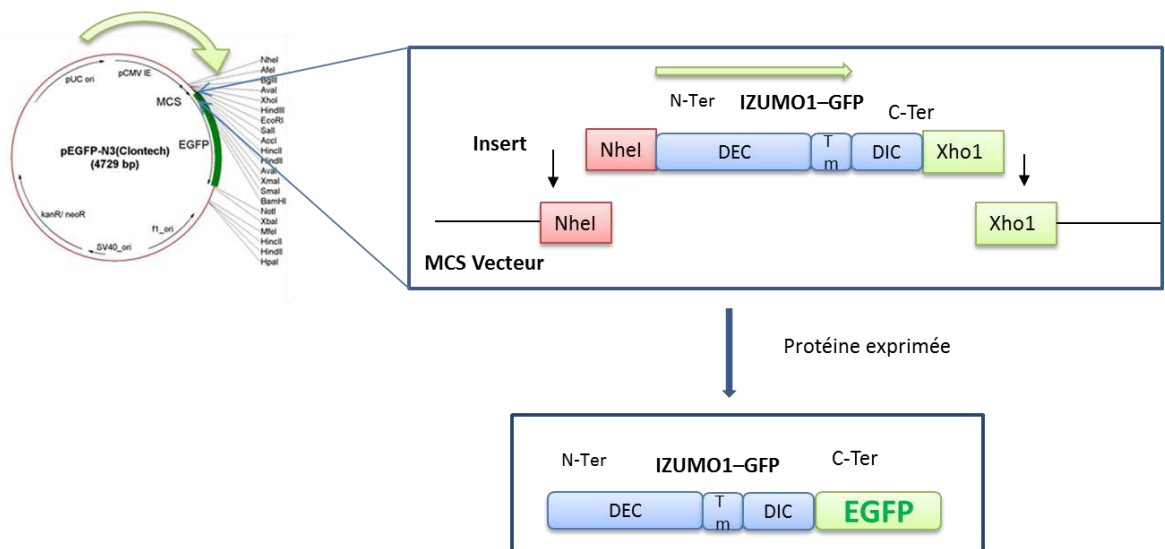


Figure 26 : La séquence codant pour Izumo1Q9D9J7 (IZUM1_MOUSE) sans le codon stop acides aminés 1 – 396 et sous clonée dans les sites Nhe1 et Xho1 de pEGFP-N1. Le vecteur d'expression obtenu plzumo1-EGFP permet d'exprimer la protéine Izumo1-EGFP à la membrane cellulaire.

Les quatre lignées sélectionnées ont été transfectées par transfection transitoire par les plasmides obtenus. Le protocole de transfection que nous avons utilisé pour la suite de notre travail est en annexe 3. Seules les cellules de la lignée Thp1, n'a pas répondu à ce protocole, le rendement de transfection était inférieur à 1%. Celui-ci était aux alentours de 5% pour les cellules des lignées K562 et MDA et supérieur à 50% pour les cellules U2OS. Nous avons décidé de travailler avec les cellules de la lignée K562 car les plus faciles à manipuler et d'utiliser les lignées MDA et U2OS pour effectuer les expériences témoin.

3. Validité du modèle

a. La validation du protocole d'Immuno-marquage

Après transfection, pour s'assurer de la présence d'Izumo1 à la surface de la membrane des cellules transfectées, nous avons procédé à l'immuno-marquage des cellules par un anticorps Anti-Izumo1 monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire de la protéine puis par un secondaire fluorescent couplé. L'analyse a été faite par imagerie confocale (microscope Leica SP5 II).

Afin de valider le protocole d'immuno-marquage, nous l'avons testé sur les spermatozoïdes où se trouve la protéine native. Pour cela, nous avons incubé des spermatozoïdes de la lignée Acr-EGFP (décrits dans la deuxième partie chapitre 1 section a.ii). Les spermatozoïdes de cette lignée ont une acrosine portant une étiquette EGFP permettant de discriminer en fluorescence les spermatozoïdes acrosome réagis des autres. Les spermatozoïdes sont incubés une heure en présence de l'anticorps anti-Izumo1 monoclonal (1/200) PBS 1x avec BSA à 1% à 37°C puis 30 minutes avec le secondaire couplé à la Rhodamine (1/50).

Comme attendu, nos résultats montrent que tous les spermatozoïdes acrosome réagis expriment Izumo1 à la membrane et pas les autres (Figure 27 A). Izumo1 est exprimée au niveau de la région antérieure de la tête du spermatozoïde et au niveau de la région équatoriale (Figure 27 B et C).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par l'équipe d'Okabe (Inoue et al. 2005; Satouh et al. 2012) et valident notre protocole de marquage.

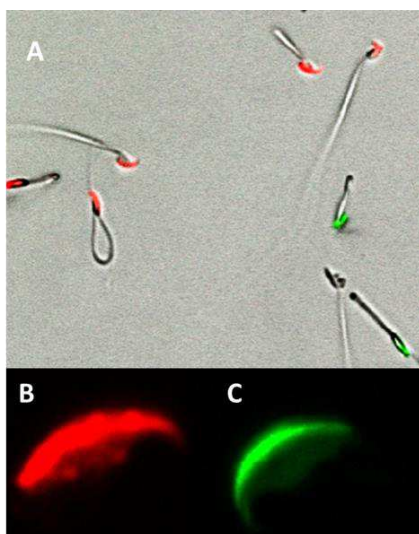


Figure 27 : A/ Spermatozoïdes marqués par Anti-Izumo monoclonal primaire et Goat anti-rat secondaire Rhodamine. Les spermatozoïdes Acr-EGFP non acrosome réagis ont l'acrosome vert. Izumo1 est révélé par l'immunomarquage sur les spermatozoïdes acrosome réagis, il apparaît en rouge. Seuls les spermatozoïdes ayant fait leur réaction acrosomique sont marqués par l'anti-Izumo1. Microscope confocal Leica. B / Spermatozoïde marqué par l'Anti-Izumo révélé par un secondaire anti-rat Rhodamine, Izumo1 apparaît en rouge au niveau de la région acrosomale. C/Spermatozoïde Acrosine-EGFP n'ayant pas fait sa réaction acrosomique, l'acrosome apparaît en vert.

b. L'absence de la protéine native

Afin de s'assurer que la protéine native n'est pas présente à la membrane des cellules à l'aide desquelles nous avons mis au point notre modèle, les cellules de la lignée K562 ont été soumises au même protocole d'immuno-marquage décrit précédemment. L'immuno-marquage négatif assurent que les cellules des 3 lignées sélectionnées n'expriment pas la protéine native.

c. Vérification de l'expression des protéines exogènes

i. L'expression d'Izumo1 exogène par le vecteur pCAGGS-Izumo1-RFP

Les cellules K562 sont transfectées et cultivées dans le RPMI, leur milieu habituel, comme décrit dans la 2^{ème} partie matériel et méthodes au chapitre 2. Afin de vérifier l'expression d'Izumo1 à la membrane, les cellules sont incubées une heure en présence de l'anti-Izumo1 monoclonal (1/200) PBS 1x avec BSA à 1% à 37°C et révélées avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (1/50). Les acquisitions sont faites à l'aide d'un microscope confocal Leica SP5II.

Toutes les cellules exprimant la RFP, expriment également Izumo1. Aucune des cellules pour lesquelles le protocole de transfection a échoué, n'est positive à l'immuno-marquage. Des cellules K562 transfectées avec le pCAGGS-RFP seul et des cellules K562 ont également été testées à la recherche de faux positifs. Il n'y a pas de couplage non spécifique des cellules K562 non transfectées ou transfectées par le vecteur vide ni avec l'anticorps monoclonal anti-Izumo1 que nous avons utilisé, ni avec l'anticorps fluorescent secondaire.

Les clones transitoires que nous avons donc obtenus expriment bien Izumo1 à leur membrane (Figure 28). Nous avons appelé ces cellules K562-Izumo1-RFP.

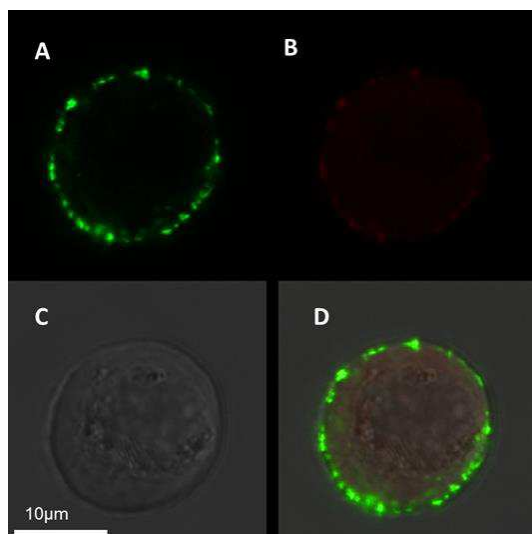


Figure 28: Cellule K562-Izumo1-RFP, anti-Izumo monoclonaal, goat anti-rat Alexa488. Imagerie confocale, microscope Leica.

A / La protéine révélée par l'anticorps est bien membranaire.

B / La RFP apparaît dans le cytoplasme.

C / Image en transmission.

D / La protéine exogène est révélée à la membrane et la RFP apparaît dans le cytosol.

ii. L'expression d'Izumo1-EGFP par le vecteur plzumo1-EGFP

Nous avons transfecté les cellules K562 par le plasmide plzumo1-EGFP de manière transitoire comme décrit précédemment. L'analyse par imagerie confocale montre que les cellules obtenues expriment l'EGFP à la membrane mais également en intracellulaire (Figure 29).

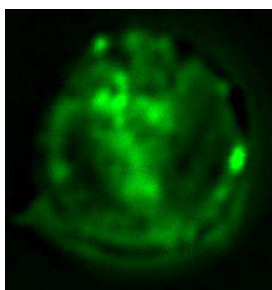


Figure 29: Cellule K562-Izumo1-EGFP. Imagerie confocale, microscope Leica. Izumo1-EGFP apparaît dans toute la cellule.

Afin de s'assurer qu'Izumo1 portant l'étiquette EGFP est bien adressé à la membrane, la même technique d'immuno-marquage utilisée pour les cellules K562-Izumo1-RFP a été appliquée. Le secondaire utilisé était un anticorps couplé à la Rhodamine. Ces cellules expriment bien la protéine d'intérêt à la membrane (Figure 30). Les cellules contrôles : cellules transfectées par le vecteur vide et les cellules ayant subi le protocole de transfection mais qui n'expriment pas la protéine, sont négatives. Nous avons appelé ces clones transitoires K562-Izumo1-EGFP.

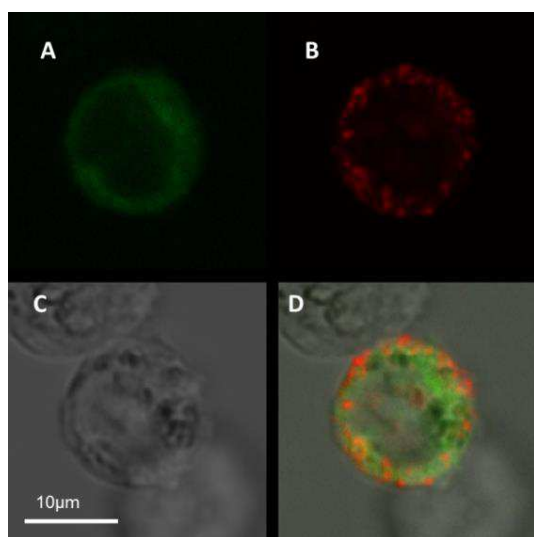


Figure 30: Cellule K562-Izumo1-EGFP. Imagerie confocale.

A/ La cellule exprimant la protéine Izumo1-EGFP.

B /La protéine révélée par l'anti-Izumo1

monoclonal et le goat anti-rat Rhodamine.

C/ Image en transmission.

D/ Izumo1-EGFP est visible dans le cytosol mais est bien présent au niveau de la membrane de la cellule.

Nous avons ainsi obtenu deux constructions qui permettent au modèle cellulaire pour lequel nous avons opté d'exprimer la protéine Izumo1 correctement à la membrane.

d. La quantification Cellule/ spermatozoïdes par imagerie confocale

Afin de pouvoir comparer d'un point de vue qualitatif une éventuelle fonction de la protéine exogène, les densités d'expression membranaire du modèle cellulaire que nous avons généré et du spermatozoïde ont été comparées.

Pour cela, nous avons appliqué le même protocole d'immuno-marquage à 20 cellules K562-Izumo1-RFP et 20 spermatozoïdes (voir paragraphe b de cette même section). Les cellules ont été fixées au Paraformaldehyde à 4% (PFA) après immuno-marquage pour éviter la perméabilisation des cellules et de révéler la protéine intracellulaire. L'observation a été faite au microscope confocal Leica SP5 II dans les mêmes conditions de puissance d'excitation laser, de détection par les tubes photo-multiplicateurs (PMT) et d'ouverture du pinhole.

Dans un premier temps nous avons déterminé l'ouverture du pinhole minimale pour être en épifluorescence. Nous avons effectué des acquisitions à différentes ouvertures jusqu'à l'obtention d'un plateau qui indique que nous avons le maximum de fluorescence émise par toute la cellule. Ensuite nous avons déterminé la hauteur à laquelle il fallait faire les acquisitions. Pour cela nous avons fait des tranches (succession d'acquisitions à différentes hauteurs) pour les cellules puis effectué les réglages de gains des photomultiplicateurs afin qu'il n'y ait pas de saturation de fluorescence. Nous atteignons l'épifluorescence pour une ouverture de pinhole à 300 μm objectif 10x.

L'analyse des images a été faite au moyen du logiciel Image J. Pour chaque cellule et spermatozoïde l'intensité de fluorescence totale a été déterminée en circonscrivant la zone fluorescente et moyennée par unité de surface.

Les histogrammes de densité de fluorescence des cellules K562 exprimant Izumo1 et des spermatozoïdes montrent des niveaux de densité de fluorescence légèrement plus élevés pour les spermatozoïdes que pour les cellules K562 exprimant la protéine exogène (Figure 31).

Par conséquent si Izumo1 est capable de créer des liens entre les K562 et les ovocytes, il semble raisonnable de penser qu'une densité de liens au moins aussi grande pourra être créée entre les spermatozoïdes et les ovocytes.

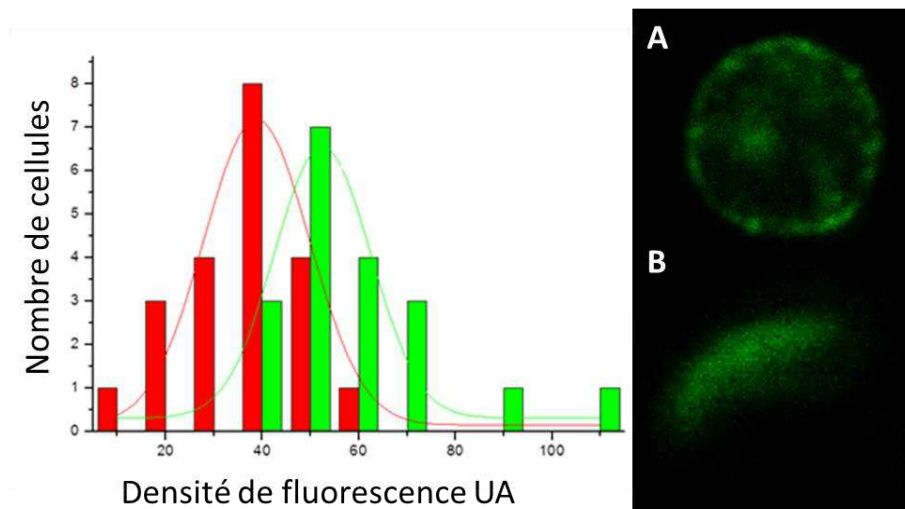


Figure 31: Nombre de cellules par classe de densité de fluorescence. En rouge les cellules K562 exprimant Izumo1 et en vert les spermatozoïdes. Les K562-Izumo1-RFP expriment des densités de fluorescence légèrement inférieures à celles exprimées par les spermatozoïdes, mais l'ordre de grandeur est comparable. A/ Cellules K562-Izumo1-RFP. B/ Spermatozoïde.

Chapitre 2 / La technique de mesure de force par micromanipulation de cellules ou Dual Pipette Assay (DPA)

1. Le principe de la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules

La technique de mesure de force par micromanipulation de cellules est une technique de micromanipulation conçue et mise au point au laboratoire par Frédéric Pincet (Chu et al. 2004; Martinez-Rico et al. 2005). Elle permet de mesurer la force nécessaire pour rompre les liens entre une cellule exprimant un ligand et une autre cellule exprimant son récepteur spécifique.

Les deux cellules sont manipulées avec deux micropipettes sous microscope. Un système hydraulique permet de contrôler la pression dans les micropipettes et donc l'aspiration appliquée aux cellules. Les deux cellules sont mises en vis à vis, translatées puis mises en contact grâce à des micromanipulateurs qui permettent de contrôler leur déplacement dans les trois dimensions de l'espace (Figure 32).

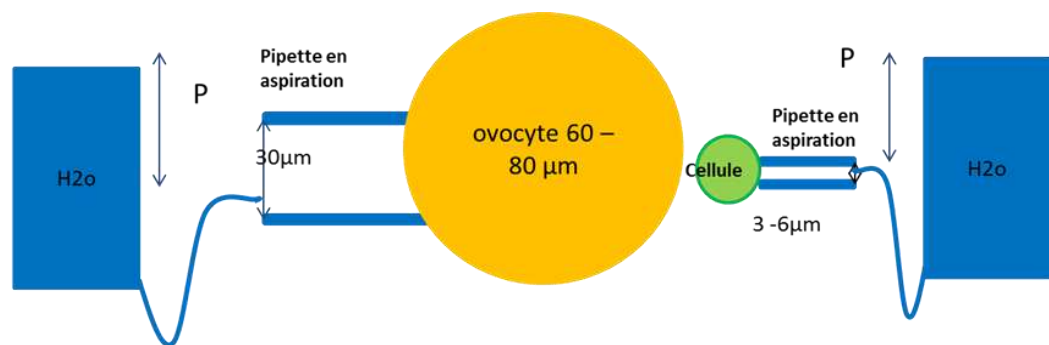


Figure 32 : Schéma décrivant le principe du DPA. L'ovocyte et la cellule sont maintenus par deux micropipettes toutes deux reliées à un système de réservoirs qui permet de contrôler l'aspiration exercée sur les cellules.

La figure 33 illustre le principe et le déroulement d'une mesure : Nous appellerons pipette A la pipette qui maintient l'ovocyte et pipette B celle qui maintient la cellule. Les deux cellules sont maintenues en aspiration et se font face sur le même axe transrationalnel. La force d'aspiration dans la pipette A est forte pour maintenir l'ovocyte, l'aspiration dans la pipette B est incrémentée par paliers (Figure 33). A chaque palier les pipettes sont translatées et écartées, si les deux cellules restent en contact, l'aspiration dans la pipette est augmentée et ceci jusqu'à la séparation des deux cellules. Si la pression dans la pipette B produit une aspiration inférieure à la force nécessaire pour dissocier les deux cellules, les cellules restent en contact et l'aspiration est augmentée. Au bout du nième

incrément, l'aspiration dans la pipette B devient supérieure à la force de dissociation, les cellules se détachent. La force de séparation des deux cellules est alors estimée par la relation suivante :

$$F_s = (\Delta P_{n-1} + \Delta P_n) \pi r_p^2 / 2$$

- P_{n-1} est la pression dans la pipette B à $n-1$
- P_n est la pression dans la pipette B à n
- r est le rayon intérieur de la pipette B

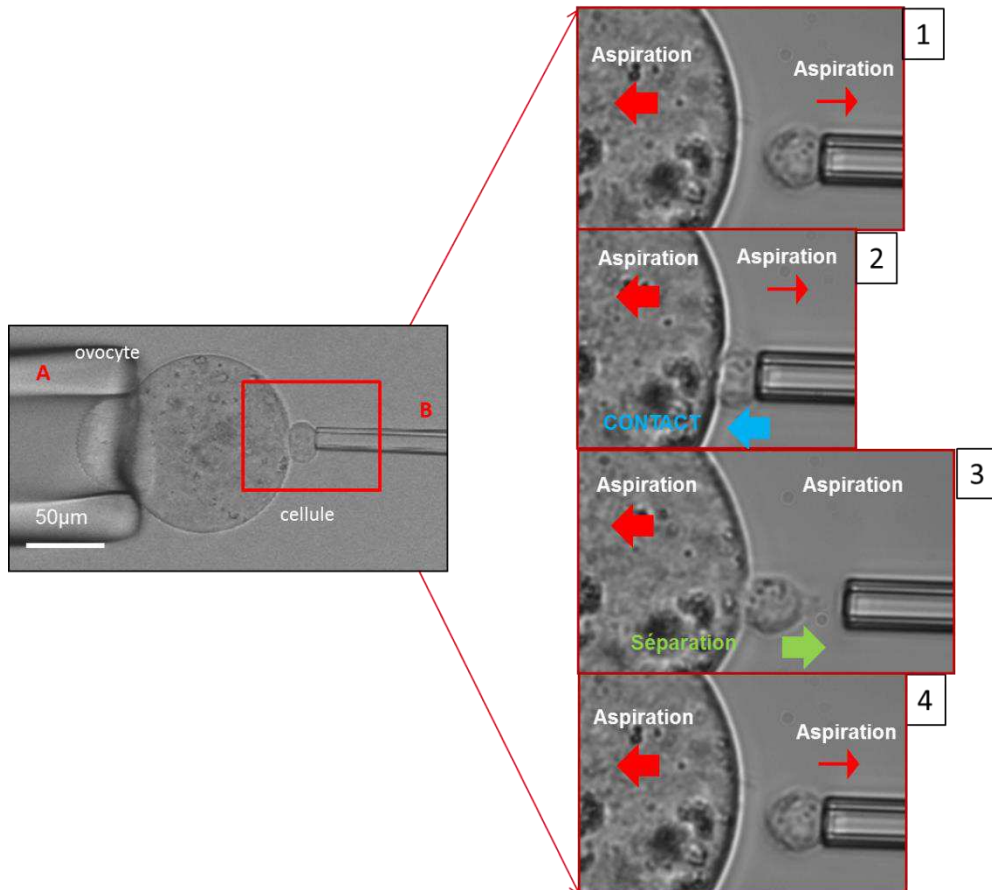


Figure 33: Mesure de force par micromanipulation de cellules : la mesure consiste en la répétition d'un cycle permettant de déterminer la force de séparation des deux cellules mises en contact pendant une durée donnée. La mesure débute par la manipulation des deux cellules maintenues aspirées par des micropipettes se faisant face, dans notre cas l'ovocyte et la cellule (1). Les deux cellules sont mises en contact (2). L'ovocyte est maintenu fortement aspiré par la pipette A. Au cycle $(n-1)$, l'aspiration dans la pipette B est P_{n-1} . La pipette B est écartée. Les deux cellules demeurent en contact (3). Au cycle n , la pipette B est rapprochée et l'aspiration dans la pipette B est maintenant P_n . L'écartement de la pipette B conduit à la séparation du doublet de cellules. Les deux derniers cycles décrits permettent d'obtenir la force de séparation.

2. Le système expérimental

La chambre expérimentale est une boîte de Pétri, dans laquelle sont déposées plusieurs gouttes de milieu M2 à 3% de BSA. Les ovocytes sont déposés dans une goutte de 30 μ l par trois ou quatre. Les cellules sont déposées dans une goutte en vis-à-vis de celles des ovocytes.

L'expérience se déroule à 37°C sous huile Medicult. Les micropipettes sont disposées de manière à ce que la micropipette de contention fasse face à la micropipette de la cellule. L'aspiration est contrôlée grâce à un système hydraulique continu reliant les micropipettes à des réservoirs à eau. L'aspiration exercée par les micropipettes sur les cellules est fixée manuellement en modifiant la pression dans les réservoirs à eau. Avant chaque expérience, l'aspiration dans le système est vérifiée pour ne pas introduire de biais de mesure.

Les cellules et les ovocytes sont mis dans deux gouttes séparées. Les cellules sont sélectionnées sous contrôle de la fluorescence au moment de l'expérience. Elles sont ensuite translatées dans la goutte de l'ovocyte à l'aide de la pipette de contention. Elles sont maintenues sous aspiration contrôlée et mises en contact avec l'ovocyte pendant un temps déterminé puis séparées (Figure 34). Ce dispositif est installé sur deux microscopes : un microscope optique inversé Leica DM-IRB disposant d'objectifs 10x et 63x et un microscope confocal Leica SP5 II (Leica) disposant d'objectifs 10x, 63x et 40x à immersion. Le microscope confocal Leica SP5 II est contrôlé par le logiciel LAS AF Lite (Leica Microsystems).

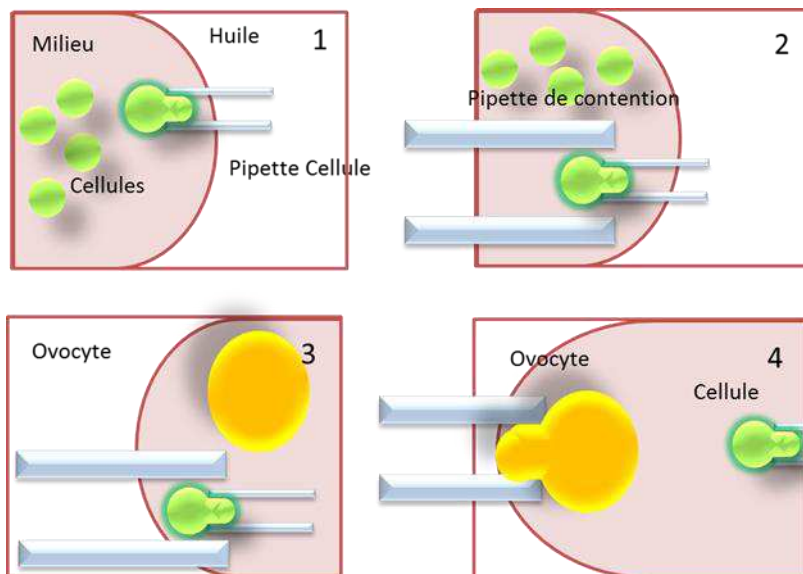


Figure 34 : Schéma décrivant le dispositif expérimental.

1 et 3/ Les ovocytes et les cellules sont disposés dans deux gouttes de milieu séparées sous huile à 37°C.

2 ET 3/ La cellule est transférée de la goutte des cellules vers la goutte des ovocytes à l'aide de la pipette de contention.

4/ Les deux micropipettes se font face et sont translatées au moyen de micromanipulateurs.

Chapitre 3 / Résultats de l'approche cellulaire

L'étude de l'éventuelle interaction médiée par Izumo1 entre la cellule exprimant la protéine exogène et l'ovocyte a été abordée par deux méthodes expérimentales. Nous présenterons dans la première partie de ce chapitre les expériences d'incubation des cellules K562 exprimant les protéines exogènes avec les ovocytes qui nous ont permis de mettre en évidence la propriété adhésive de la protéine. La seconde partie sera consacrée aux résultats obtenus par la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale. Les propriétés révélées par cette approche seront discutées dans une troisième partie.

1. Izumo1 induit une adhésion spontanée avec l'ovocyte

Nous avons voulu déterminer dans un premier temps si les cellules exprimant Izumo1 pouvaient développer une adhésion spontanée avec l'ovocyte. Des cellules K562 exprimant Izumo1 exogène et exprimant Izumo1-EGFP ont été triées par cytométrie et incubées avec des ovocytes (2 000 cellules par ovocyte) pendant une heure à 37°C en milieu CO₂ indépendant sous agitation douce. Les ovocytes ont été ensuite rincés et les cellules qui sont restées accrochées comptées.

Nos résultats montrent que les cellules K562 exprimant les protéines exogènes restent attachées à l'ovocyte après trois rinçages. Cela concerne aussi bien les cellules qui expriment Izumo1 que celles qui expriment Izumo1-EGFP. Le taux d'adhésion moyen est de 19 cellules par ovocyte pour les cellules K562-Izumo1-RFP et 20 cellules par ovocyte pour les cellules K562-Izumo1-EGFP (Figure 35). Cette adhésion est très stable dans le temps, même après plusieurs heures les cellules demeurent collées. Nous avons également pu observer un rehaussement de l'intensité de l'EGFP dans la zone de contact indiquant un recrutement probable de la protéine (Figure 35 C). Ces résultats sont complétés par des tests d'incubation de contrôle : les cellules K562 non transfectées ayant été incubées avec les ovocytes provenant des mêmes souris dans les mêmes conditions. Aucune adhésion n'est observée entre les cellules du groupe contrôle et les ovocytes et ce même avant tout rinçage.

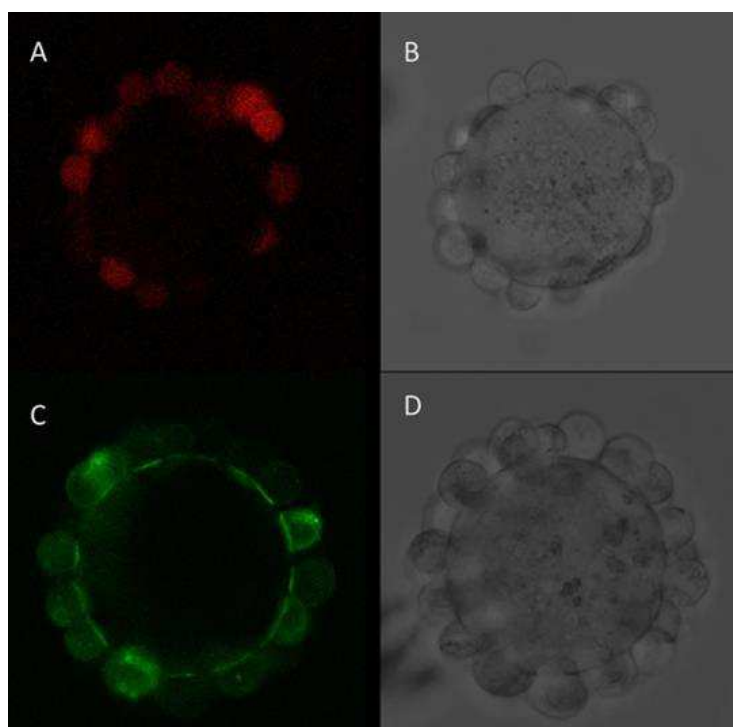


Figure 35 : Ovocytes incubés avec des cellules K562 exprimant les protéines exogènes. Imagerie Confocale (Leica SP5 II).

A et B : Cellules K562-Izumo1-RFP adhérant à un ovocyte, A image en fluorescence B en transmission ; toutes les cellules qui adhèrent expriment la RFP et donc expriment Izumo1 exogène.

C et D : cellules K562-Izumo1-EGFP, C image en fluorescence B en transmission ; toutes les cellules adhérant à l'ovocyte expriment Izumo1-EGFP, une intensification de la fluorescence est visible au niveau de l'aire de contact indiquant une densification de la protéine.

Izumo1 induit bien une adhésion spontanée avec l'ovocyte, celle-ci est stable car on ne la voit pas se défaire dans le temps. Les mêmes résultats étant observés avec les cellules K562-Izumo1-RFP et les K562-Izumo1-EGFP, il semble que la partie cytosolique de la protéine exogène Izumo1-EGFP n'interfère pas avec cette adhésion.

2. Etude de l'adhésion induite par Izumo1 par la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale

a. Izumo1 induit une adhésion forte avec recrutement au niveau de la zone de contact

La technique de mesure de force par micromanipulation de cellules constitue une approche intéressante pour notre modèle d'étude car elle permet de quantifier l'adhésion induite par la protéine exogène entre les cellules qui l'expriment et l'ovocyte à l'échelle de la cellule unique dans des conditions mimant les conditions physiologiques où un seul spermatozoïde est en contact avec l'ovocyte. Nous pouvons contrôler le temps de contact ainsi que la zone de contact et tester ainsi différentes régions de la membrane de l'ovocyte. Cette technique a toutefois l'inconvénient d'induire un contact initial par une force non contrôlée.

Lors de cette expérience les cellules K562-Izumo1-RFP ont été testées par cette technique. Elles ont été mises en contact 1 min avec l'ovocyte puis séparées. Les observations ont été faites sous microscope Leica inversé muni d'une lampe à fluorescence et d'une caméra CCD sous objectif 63x (Figure 36). Nos résultats montrent que :

1. 100% des doublets cellules K562-Izumo1-RFP exprimant la protéine exogène Izumo1/ovocytes testés adhèrent.
2. Cette adhésion est forte car elle entraîne une déformation importante de la cellule et de l'ovocyte lorsqu'on essaie de les séparer (Figure 36). La force de dissociation moyenne est estimée $4,24 \pm 2,6$ nN.
3. Lors de la séparation, l'aire de contact diminue et se rétrécit en partant des extrémités vers le centre faisant penser à un effet de pelage précédemment décrit par Evan Evans entre des globules rouges et des cellules endothéliales (Mohandas & Evans 1984). Toutefois lors de la séparation un lien persiste sous forme de filament entre l'ovocyte et la cellule K562-Izumo1-RFP (Figure 36B).
4. Nous n'avons pas observé d'adhésion dans le groupe contrôle constitué par les cellules K562 transfectées par le plasmide vide et les ovocytes provenant des mêmes souris et ce même après 5min de temps de contact.

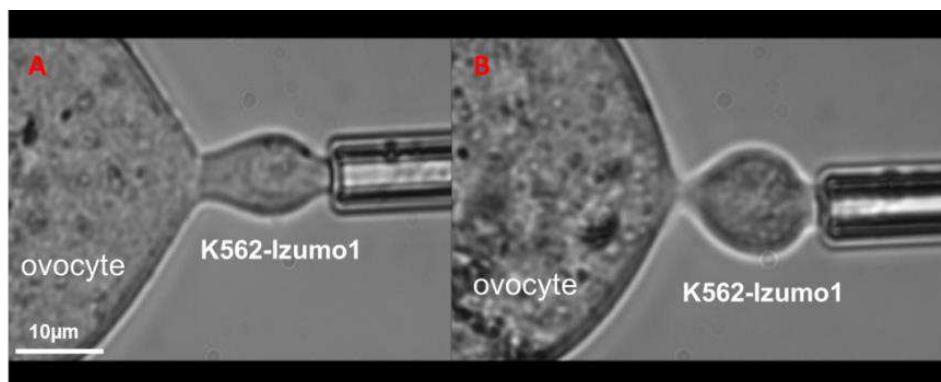


Figure 36 : Mesure de force par micromanipulation. Doublet cellule K562-Izumo1-RFP/Ovocyte. Le taux d'adhésion est de 100% et la force de dissociation moyenne de $4,24 \pm 2,6$ nN.

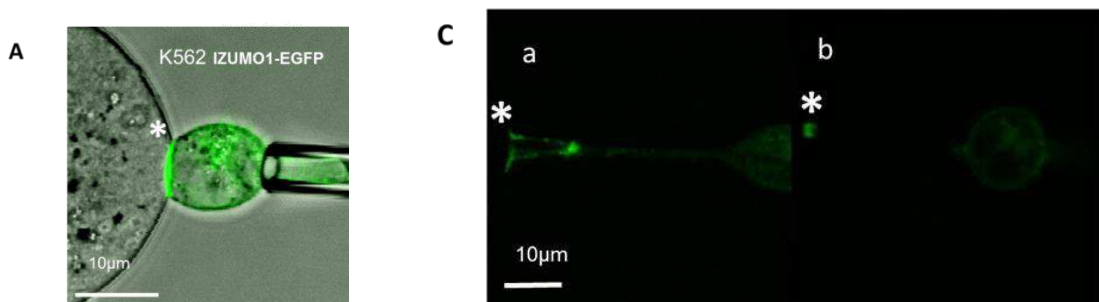
A/ Séparation à une minute de contact : la force d'aspiration ne permet pas de séparer les deux cellules, celles-ci adhèrent fortement et se déforment.

B/ La force d'aspiration a été incrémentée dans la pipette de la cellule; les deux cellules se détachent mais un lien membranaire semble persister.

Les résultats des expériences d'incubation ont montré que les cellules exprimant la protéine Izumo1-EGFP adhèrent également à l'ovocyte. Izumo1-EGFP semble se densifier au niveau de la zone de contact.

Nous avons testé les doublets cellules K562-Izumo1-EGFP/ovocytes par la technique de mesure de force par micromanipulation que nous avons couplée à l'imagerie confocale. Nous avons appliqué la même procédure expérimentale que décrite pour les cellules K562-Izumo1-RFP. Les observations ont été faites sous microscope confocal Leica SP5 II. L'objectif de ces expériences était de visualiser l'aire de contact au moment de l'adhésion et au moment de la séparation afin d'évaluer l'énergie d'adhésion mise en jeu, de suivre la dynamique de recrutement et de voir si ce recrutement était d'origine membranaire dû à des propriétés de diffusion de la protéine.

Nos résultats ont en partie confirmé ceux obtenus par les expériences d'incubation : les cellules K562-Izumo1-EGFP adhèrent fortement à l'ovocyte et entraînent une forte déformation de l'ovocyte et de la cellule. Nous avons également observé une intensification de la fluorescence au niveau de la zone de contact augmentant avec le temps indiquant un recrutement d'Izumo1-EGFP au niveau de cette région (Figure 37 A et B). En revanche lors des essais de détachement, en incrémentant l'aspiration et en essayant d'éloigner les cellules, nous avons observé que la partie de la membrane cellulaire exprimant Izumo1-EGFP reste attachée à l'ovocyte, l'aire de contact n'est en fait pas diminuée comme le suggèrent trompeusement les observations sans fluorescence et il n'y a pas d'effet de pelage car les membranes ne sont pas dissociées (Figure 37 B). En exerçant une forte traction, un filament de la membrane cellulaire est étiré et reste attaché à l'ovocyte (Figure 37 B et C). Ce filament a pu être observé en fluorescence. Si on éloigne encore plus les cellules, le filament se rompt. Après séparation, un patch de fluorescence demeure donc au niveau de la membrane ovocytaire (Figure 37 C). Il est donc en réalité impossible d'obtenir une énergie d'adhésion ou même une force de rupture car celle-ci est supérieure à la force nécessaire pour déformer voire rompre la cellule. Nous pouvons juste affirmer qu'elle est supérieure à la force de $4,24 \pm 2,6$ nN évaluée précédemment.



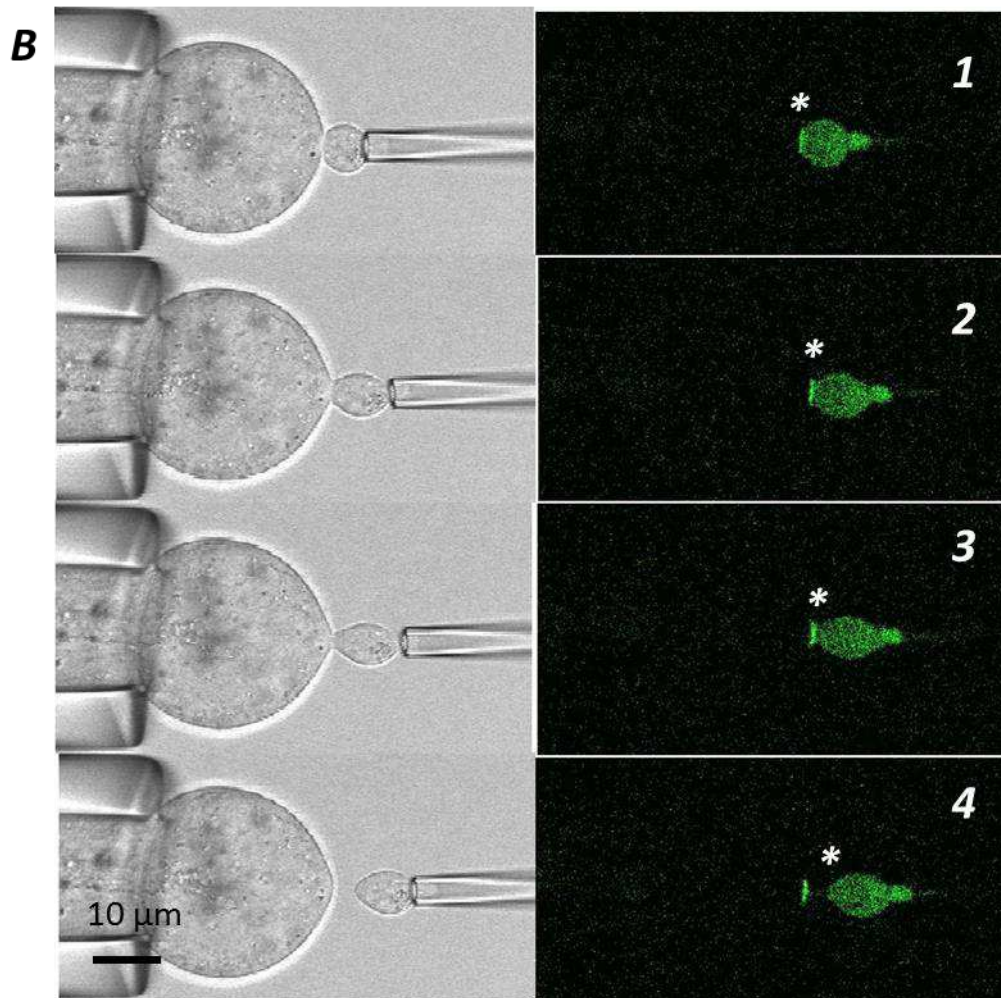


Figure 37 : Cellules K562-Izumo1-EGFP adhérant à l'ovocyte après une minute de temps de contact. Les cellules sont micromanipulées par des micropipettes sous microscopie confocale. La zone de contact est indiquée par *.

A/ Densification de la protéine au niveau de la zone de contact entre la cellule K562-Izumo1-EGFP et l'ovocyte.

B/ Détachement :

- 1) les cellules sont en contact, nous observons le recrutement de la protéine au niveau de la zone d'adhésion.
- 2) Début de séparation : l'ovocyte et la cellule se déforment fortement mais la zone de contact est la même.
- 3) L'aspiration est incrémentée dans la micropipette de la cellule, la zone de contact est déformée mais n'est pas modifiée.
- 4) La cellule est fortement aspirée et séparée : la zone de contact resté collée sur l'ovocyte.

C/ Après le détachement un filament de membrane est étiré. a / La zone de contact n'est pas modifiée. b/ La membrane de la cellule est restée collée à l'ovocyte après rupture du filament.

Izumo1 induit une adhésion forte que nous n'avons pas pu quantifier. Nos résultats nous permettent d'affirmer que dans nos conditions expérimentales la force nécessaire pour séparer la cellule exprimant Izumo1 exogène et l'ovocyte est supérieure à celle nécessaire pour rompre l'intégrité de la membrane de la cellule. L'aire de contact ne diminue pas lors de la séparation des cellules.

b. Cinétique de recrutement et cinétique de fluorescence

Nos résultats montrent qu'Izumo1 est recrutée au niveau de la zone de contact. Afin de suivre ce recrutement nous avons suivi par microscopie confocale la cinétique de la fluorescence de la protéine Izumo1-EGFP. Les cellules K562-Izumo1-EGFP et les ovocytes ont été mis en contact par micromanipulation comme décrit précédemment. La cinétique de fluorescence est suivie par imagerie confocale. Les résultats des analyses des films qui sont présentés dans la suite ont été obtenus par traitement avec les logiciels LAS AF Lite (Leica Microsystems) et Image J (National Institute of Health).

L'évolution de l'aire de contact a été obtenue en analysant l'évolution de zone d'enrichissement totale en fonction du temps. L'aire effective d'enrichissement dans la zone de contact augmente jusqu'à atteindre un plateau correspondant à l'aire de contact totale au bout de 5 min environ. La taille de l'aire de contact donc de la surface maximum enrichie en Izumo1 dépend des capacités de déformation de la cellule, limitées par la présence de son cytosquelette (Figure 38 A).

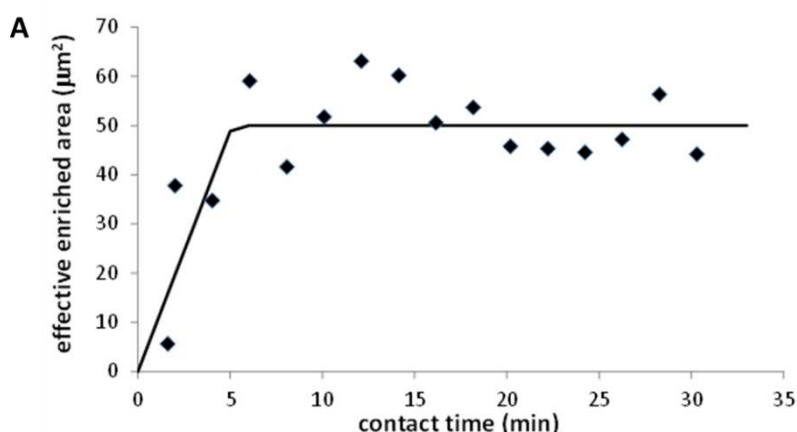


Figure 38 A/ L'aire effective de la zone d'enrichissement en Izumo1 augmente rapidement pour atteindre un plateau correspondant à la totalité de l'aire de contact au bout de 5 minutes environ.

L'évolution du recrutement de la protéine a été déduite de l'analyse de l'intensité totale de fluorescence au niveau de la zone de contact en fonction du temps. Pour chaque temps, des acquisitions par tranche verticale de 1 à 2 μm ont été faites afin de couvrir toute la hauteur de la

zone de contact. L'intensité de fluorescence totale a été ainsi reportée en fonction du temps et normalisée par l'aire de contact effectivement enrichie au temps associé. Nos résultats montrent que la zone de contact est saturée en protéine Izumo1 après environ 20 min de contact (Figure 38 B).

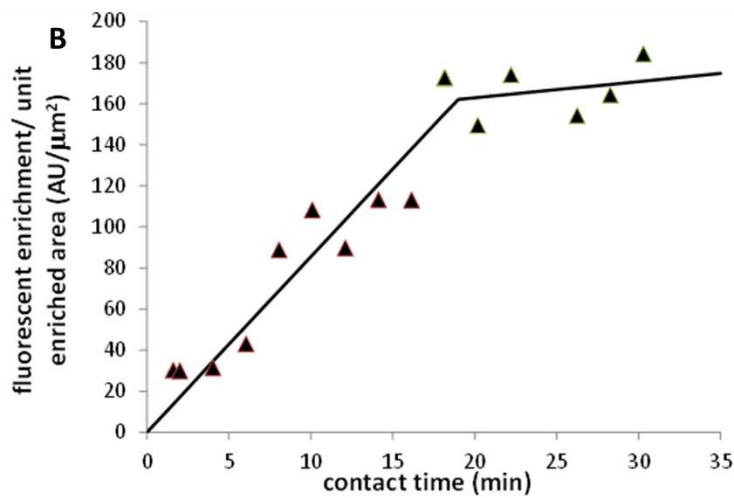
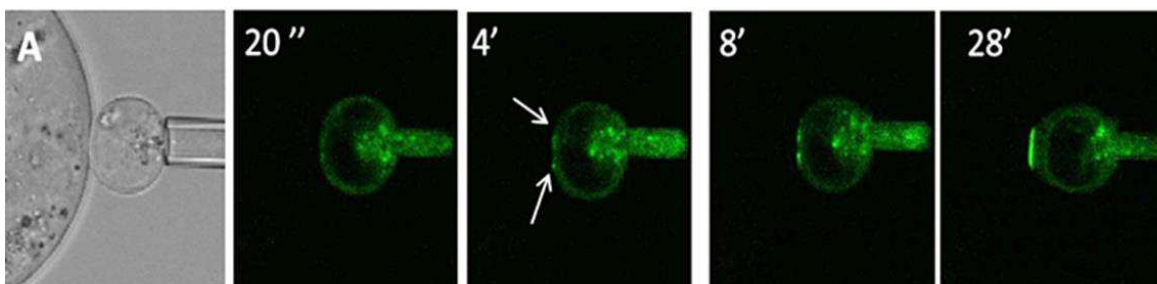


Figure 38 B/ Le recrutement de la protéine au niveau de la zone de contact augmente jusqu'à la 20ème minute, la pente ralentit ensuite pour atteindre le plateau.

En analysant l'intensité de fluorescence par section à différents temps nous avons pu suivre la formation de cette zone de contact. Pour chaque temps, à l'équateur de la cellule, une ligne est tracée au niveau de la zone de contact, une autre légèrement décalée vers l'intérieur de la cellule. Les profils de fluorescence sont relevés et le profil correspondant à la seconde ligne est retranché à celui de la première de façon à obtenir le profil d'enrichissement d'Izumo1 uniquement. Ces profils d'enrichissement sont reportés à différents temps sur les graphiques de la figure 39 B. On note que l'enrichissement commence par des points de nucléation et ce dès les premières secondes après mise en contact. Ces points augmentent de taille et en intensité et confluent pour couvrir toute la zone de contact (Figure 39 A).



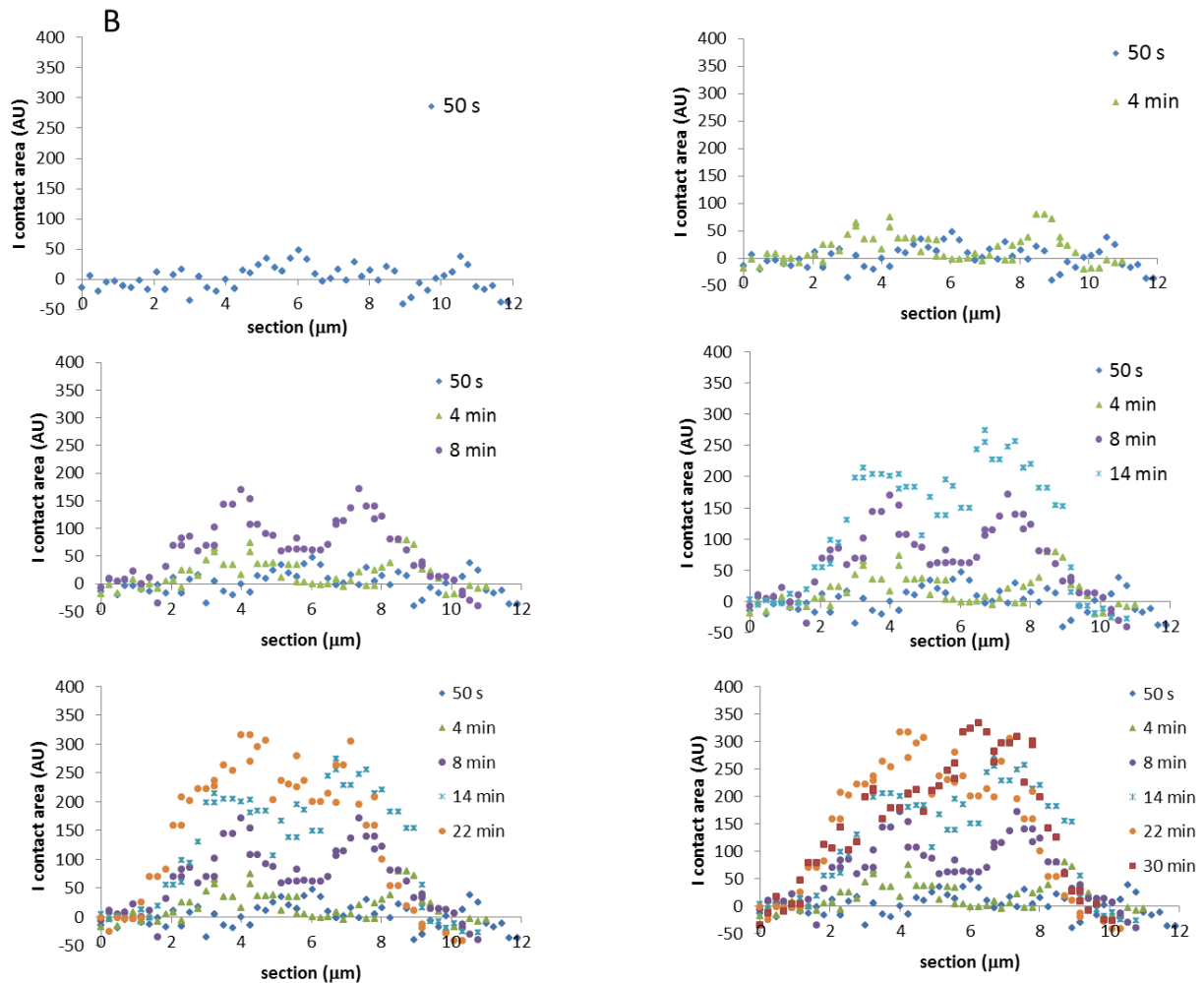


Figure 39 : Le recrutement d'Izumo1 au niveau de la zone de contact se fait par des points de nucléation.

A/ Section d'une cellule K562-Izumo1-EGFP : dès les premières secondes Izumo1 commence à être recruté au niveau de la zone de contact. Les points de nucléations sont indiqués par des flèches. A la 4ème minute la zone de recrutement s'est nettement densifiée. A 28 minutes toute la zone de contact est saturée en protéine.

B/ Graphique montrant l'évolution de ces points de nucléation par section.

3. L'adhésion observée est indépendante du modèle cellulaire

Izumo1 est une protéine qui développe des interactions en Cis avec d'autres protéines spermatiques (Inoue et al. 2010; Ellerman et al. 2009). Est-il possible que l'adhésion que nous avons observée ne résulte pas directement d'une interaction en trans d'Izumo, mais de celle d'une protéine présente à la membrane des K562 avec laquelle Izumo1 s'associerait et qu'il activerait ? Pour tester cette éventualité, nous avons utilisé deux autres modèles cellulaires : les cellules MDA et les cellules U2OS (Chapitre 1 de cette partie). Nous avons appliqué le même protocole de transfection

transitoire que celui utilisé pour les cellules K562 et nous avons testé les cellules exprimant Izumo1-EGFP par le même protocole expérimental.

Nous obtenons les mêmes résultats que pour les cellules K562 : une adhésion stable dans le temps, suffisamment forte pour entraîner une importante déformation des cellules, une rupture de leur membrane lors des tentatives de détachement et une relocalisation de la protéine au niveau de la zone de contact (Figure 40).

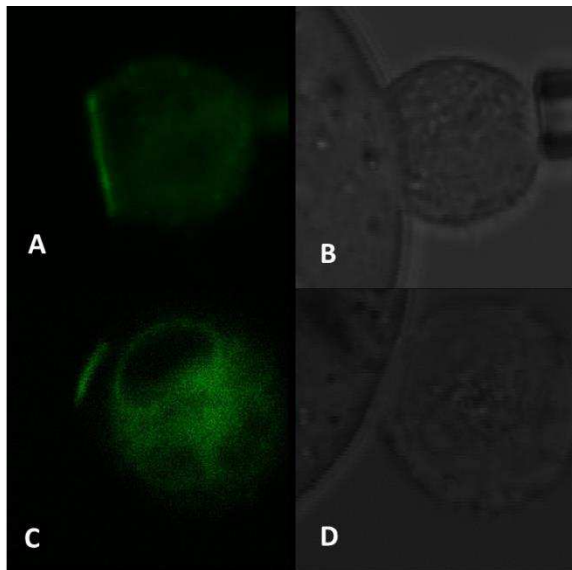


Figure 40

A et B : Cellules de la lignée MDA-Izumo1-EGFP adhèrent à l'ovocyte. A/ Image en fluorescence : Izumo1-EGFP est recruté au niveau de la zone de contact. B / Cellule MDA-Izumo1-EGFP en transmission.

C et D : Cellules de la lignée U2OS-Izumo1-EGFP adhèrent à l'ovocyte. C/ Image en fluorescence : Izumo1-EGFP est recrutée au niveau de la zone de contact. D / Cellule U2OS-Izumo1-EGFP en transmission.

Ces résultats rendent donc assez improbable une action indirecte d'Izumo1. En effet une telle éventualité nécessiterait que le partenaire en d'Izumo1 interagissant en trans avec l'ovocyte soit non seulement présent sur les 3 types cellulaires testés, mais également inactif tant qu'il n'interagit pas avec Izumo1 puisque les cellules n'adhèrent pas aux ovocytes avant transfection.

Conclusion et discussion des résultats obtenus par l'approche cellulaire

Le modèle que nous avons mis au point nous a permis de montrer qu'Izumo1 développe une adhésion avec l'ovocyte. En effet, nos résultats indiquent qu'Izumo1 joue un rôle dès l'étape d'adhésion et ce en interagissant elle-même avec un ou plusieurs partenaires de la membrane de l'ovocyte. Cette interaction en Trans n'exclut pas une interaction avec des molécules partenaires de la membrane spermatique qui seraient elles-mêmes impliquées dans les étapes d'adhésion et/ou de fusion (Stein et al. 2006; Ellerman et al. 2009).

Ce partenaire est largement exprimé par la membrane ovocytaire. Lors des expériences de co-incubation nous avons montré qu'un ovocyte se liait en moyenne à une vingtaine de cellules exprimant la protéine recombinante, la molécule partenaire est donc présente au niveau de toute la membrane de l'ovocyte (à l'exception de la zone amicrovillaire). Les analyses en fluorescence ont montré qu'Izumo1 était recruté dès les premières secondes et pouvait continuer à l'être pendant 20 minutes avant d'atteindre la saturation de la zone de contact. Sachant que notre modèle cellulaire exprime la protéine exogène dans des concentrations légèrement inférieures à celles de la protéine native exprimée par le spermatozoïde, nous pouvons avancer l'hypothèse que ce partenaire est exprimé en quantité suffisamment concentrée pour fixer très rapidement de manière forte le spermatozoïde dès les premières secondes de contact.

Ce recrutement au niveau de la zone de contact que nous avons observé prouve qu'Izumo1 est une protéine membranaire mobile qui relocalise. Cette particularité a été montrée par l'équipe d'Okabe (Satouh et al. 2012). Izumo1 relocalise pour couvrir la tête du spermatozoïde et plus particulièrement la zone équatoriale. La zone équatoriale est la région où il a été montré que la fusion avait lieu. Les protéines impliquées dans les processus d'adhésion et de fusion vont se concentrer au niveau de cette région au moment de la rencontre des deux gamètes. Ainsi Izumo1 est au bon endroit, en quantité importante au moment de la rencontre des gamètes. Au vu de l'adhésion obtenue, Izumo1 doit donc être capable de faire adhérer fortement le spermatozoïde à l'ovocyte.

Ces arguments nous permettent d'avancer l'hypothèse qu'Izumo1 est une protéine impliquée directement dans l'étape d'adhésion avec un partenaire largement exprimé au niveau de la membrane de l'ovocyte et développe ainsi une adhésion forte qui permet la stabilisation du spermatozoïde et entamer le processus de fusion. Il n'est pas exclu qu'elle interagisse également avec des protéines partenaires de la membrane spermatique qui seraient elles-mêmes impliquées dans l'adhésion, la fusion voire les deux.

4ème Partie / L'approche moléculaire par la protéine recombinante

Grâce à notre modèle cellulaire, nous avons montré qu'Izumo1 confère aux cellules qui l'expriment la capacité d'adhérer aux ovocytes.

Nous avons souhaité sonder l'interaction directe entre Izumo1 et la membrane de l'ovocyte, en isolant Izumo1 de tout contexte cellulaire. L'idée de l'expérience était de remplacer la membrane cellulaire par des billes de verres fonctionnalisées avec Izumo1 et caractériser à l'échelle du lien unique, la liaison qu'une molécule d'Izumo1 est capable d'établir avec une molécule ou un complexe moléculaire de la membrane ovocytaire.

Cette partie sera divisée en 3 chapitres. Le premier sera consacré à la molécule recombinante élaborée pour cette étude, de sa conception jusqu'à la fonctionnalisation des billes de verre. Le second chapitre présentera le Biomembrane Force Probe (BFP), technique expérimentale utilisée pour sonder l'interaction entre Izumo1 et l'ovocyte à l'échelle du lien unique. Quant au troisième chapitre, il exposera les expériences et les résultats obtenus.

Chapitre 1 / Le domaine extracellulaire d'Izumo1

1. Conception de la protéine recombinante

Comme nous l'avons vu au chapitre 3 de la 1ère partie, Izumo1 est une protéine transmembranaire constituée d'un domaine extracellulaire immunoglobuline, d'un domaine transmembranaire (Izumo1 traverse 1 seule fois la membrane) et d'une courte queue cytosolique. La protéine globale est insoluble mais son domaine extracellulaire, qui est la partie susceptible de donner lieu à une interaction en trans avec l'ovocyte, lui est soluble. Dans la perspective d'une fonctionnalisation de billes telle que nous l'envisageons, la solubilité de la protéine est un paramètre important. C'est pourquoi en vue de mener cette partie de l'étude, il a été décidé de produire le domaine extracellulaire d'Izumo1 plutôt que la protéine dans sa globalité.

Afin d'obtenir le domaine extracellulaire recombinant d'Izumo1 le plus proche de celui de la protéine native, un système eucaryote (lignée cellulaire HEK 293F) permettant de maintenir les modifications post-traductionnelles a été choisi pour assurer la production de la molécule. L'utilité des modifications post-traductionnelles dans la fonction de la protéine a été soulignée dans la 1ère partie au chapitre 3.

La production de la protéine est suivie de trois étapes :

- une purification permettant de la séparer de toutes les autres protéines excrétées par la cellule
- une identification pour permettre un éventuel immuno-marquage,
- une biotinylation en vue de son accrochage aux billes de verre (préalablement recouvertes de streptavidine).

C'est pourquoi 3 étiquettes ont été intégrées à la partie C-terminal du domaine extracellulaire d'Izumo1 : une étiquette histidine pour la purification, une étiquette myc pour l'immuno-marquage et une étiquette Bad pour sa biotinylation. Nous reviendrons en détail sur ces 3 étiquettes dans les paragraphes 3 et 4 qui vont suivre. Le schéma représentant le domaine extracellulaire d'Izumo1 à produire et que nous appellerons par la suite l'ECD-Iz1 est représenté figure 41.

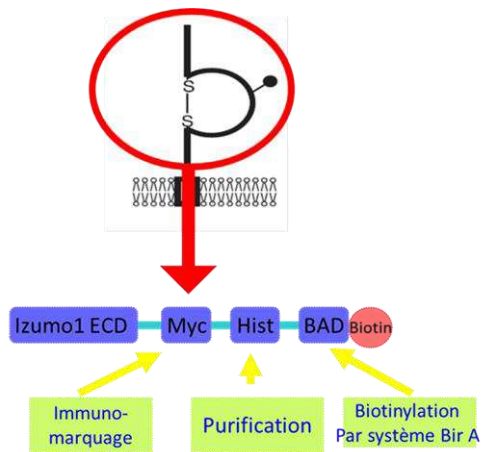


Figure 41 : Schéma de l'ECD-Iz1. La construction de l'ECD-Izumo1-Tg (His-myc-Bad) comprend le domaine extracellulaire de 1-320 acides aminés avec trois étiquettes : l'histidine permet la purification de la protéine, l'étiquette myc l'immuno-marquage et l'étiquette Bad la biotinylation.

a. Production

Le domaine extracellulaire recombinant ECD-Iz1 a été généré à partir de l'Izumo1 sauvage murin (séquence d'acides aminés de 1 à 320. Annexe 1). La construction de la séquence a été faite au laboratoire de l'unité mixte INSERM U602 "Réponses Cellulaires au Microenvironnement et Cancer" de l'hôpital Paul Brousse à Villejuif, par Virginie Barraud-Lange alors post-doctorante dans l'équipe et Claude Boucheix. ECD-Iz1 a été cloné dans un vecteur pCDNA3 (Invitrogen) (sous promoteur CMV).

La protéine recombinante a été obtenue par transfection stable de la lignée cellulaire HEK 293F, maintenue en culture au laboratoire de l'unité mixte INSERM U602. La protéine ECD-Iz1 recombinante est excrétée dans le surnageant. Sa présence y a été vérifiée par western-blot après électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) au moyen d'un anticorps anti-Izumo1 polyclonal.

b. Purification

Dans ce paragraphe, je décris le protocole que j'ai suivi pour purifier les molécules que j'ai ensuite utilisées pour l'ensemble des expériences que je présenterai au chapitre 3 de cette 4^{ème} partie. Cette purification de l'ECD-Iz1 correspond à la 7^{ème} réalisée à Villejuif (notée *P7VII dans la suite*) et provient d'une culture cellulaire du mois de mars 2011. Pour des raisons que j'expliquerai plus loin, il s'agit de la première purification avec laquelle il a été possible d'obtenir des fonctionnalisations de billes contrôlées et des résultats reproductibles.

Les protéines sont excrétées en permanence par les cellules HEK 293F dans le surnageant. Lors de chaque «passage» des cellules (procédé visant à diluer les cellules avec du milieu nutritif renouvelé et à éliminer les cellules mortes), le surnageant est filtré afin d'éliminer les protéines de

grande tailles et les débris cellulaires (Filtres 0,45µm). La protéine est récupérée au moyen d'une colonne Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) (QIAexpress System, Qiagen, France) puis éluée par une solution d'Imidazole (250mM) dans du PBS. La quantité de protéines obtenue est évaluée par migration sur gel d'électrophorèse avec révélation au Bleu de Coomassie et comparée avec une gamme de BSA. La concentration a été évaluée à environ 250µg/mL. La protéine est ensuite dialysée contre un tampon Tris-HCl 10mM pH7.7 en agitation douce au moyen de membranes de dialyse (Spectra/Por) afin d'éliminer les sels des tampons. La quantité de protéine a également été dosée par une méthode indépendante : le NanoDrop spectrophotomètre (Thermo Scientific). La valeur de 214 µg/mL trouvée est en bon accord la précédente estimation.

Afin de s'assurer que la protéine obtenue est bien conforme au domaine extracellulaire d'Izumo1 souhaité, la protéine purifiée a été révélée sur gel SDS-PAGE par l'anti-Izumo1 monoclonal. L'ECD-Iz1 est bien reconnu par l'anticorps (Figure 42).

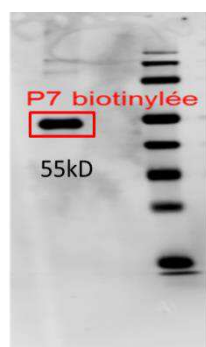


Figure 42 : La purification P7VII, révélée par l'anticorps anti-Izumo1 sur gel SDS-PAGE : ECD-Iz1 est reconnu par l'anticorps anti-Izumo1.

c. Biotinylation

Nous avons vu que pour les besoins de l'expérience, la protéine recombinante ECD-Iz1 devait être biotinylée. Cette biotinylation est basée sur un procédé enzymatique utilisant la biotine ligase (BirA) (GeneCopoeia, Tebu-Bio, France) et a été effectuée selon les indications du fabricant. Un excès d'enzyme est mis en présence de l'ECD-Iz1 en vue d'obtenir le meilleur rendement possible. L'enzyme BirA va permettre le couplage de la biotine à l'ECD-Iz1. La liaison se fait par l'étiquette Bad et ne modifie pas la séquence de la protéine. Le mélange est incubé 7 heures à 37°C au bain marie. La protéine est ensuite dialysée contre du PBS 1x afin d'éliminer entièrement l'enzyme BirA et les sels présents dans les tampons. La vérification de la biotinylation se fait par révélation à la streptavidine couplée à l'Alexa-Fluor700 (Invitrogen, France).

L'ECD-Iz1 recombinant couplé à la biotine est révélé sur gel en présence d'une protéine contrôle, dans notre cas nous avons utilisé l'ECD-Iz1 provenant d'une purification précédente (Figure 43).

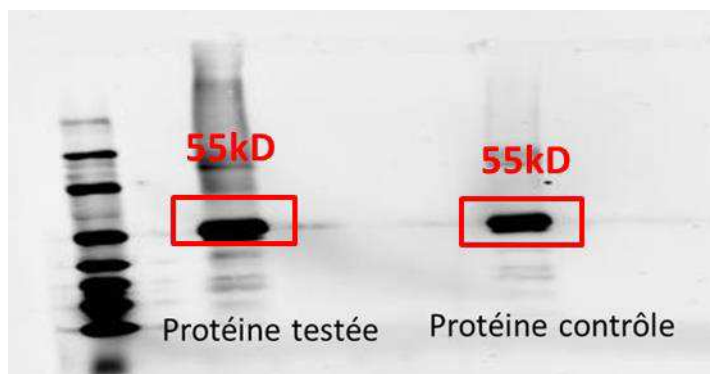


Figure 43: l'ECD-Iz1 biotinylé révélé par Straptavidine (Alexa Fluor 700 Streptavidin). La protéine contrôle est une protéine connue portant la biotine, ici c'est ECD-Iz1 de la purification précédente.

Afin d'évaluer le rendement de la biotinylation par le système BirA, nous avons fait migrer sur gel SDS-PAGE une solution mixte de streptavidine et de ECD-Iz1 biotinylé. Les données montrent que moins de 3% d'ECD-Iz1 ne sont pas biotinylés. Le rendement est donc excellent.

Nous avons pu également déterminer le nombre de molécules d'ECD-Iz1 biotinylées fixées par la streptavidine en analysant la migration sur le gel : nous avons obtenu trois bandes de migration sur gel, la plus distante correspond à la portion de 3% de la protéine recombinante non biotinylée. Les deux autres indiquent que la streptavidine fixée une à deux molécules d'ECD-Iz1 biotinylé à la fois (Figure 44).

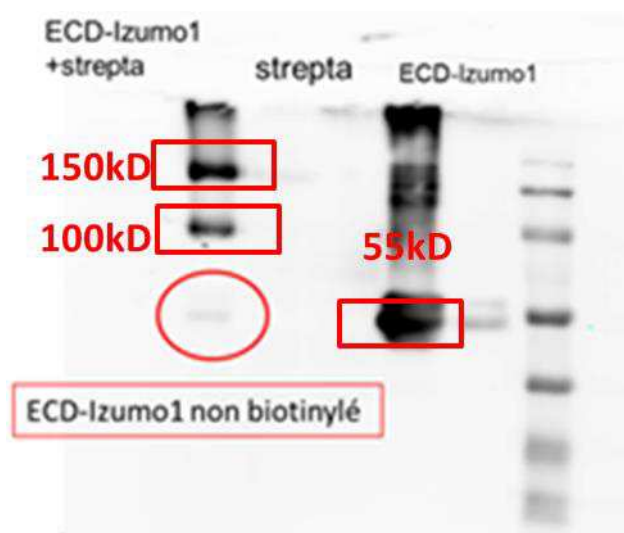


Figure 44: Solution streptavidine + ECD-Iz1 biotinylé sur gel SDS-PAGE : une très faible proportion de la protéine recombinante n'est pas biotinylée. La streptavidine se lie à deux protéines recombinantes de préférence. Nous avons ainsi obtenu le domaine extracellulaire d'Izumo1 murin utilisable seul ou couplé à la biotine.

2. Fonctionnalisation des billes de verre

Pour les expériences BFP que nous décrivons dans le chapitre suivant, les billes portant ECD-Iz1 doivent être collées à des globules rouges. Ce « collage » se fait grâce à la liaison streptavidine-biotine en biotinylant au préalable les globules rouges et en streptavidinant des billes de verre

monodisperses de 3 μm de diamètre. Pour cela, nous avons utilisé les procédures d'Evan Evans décrites en annexe 6.

La fonctionnalisation des billes streptavidine par ECD-Iz1 est une étape importante dans la mise en place du dispositif expérimental. En effet, la population de billes doit être la plus homogène possible pour ne pas introduire de biais dans l'analyse des résultats, le risque étant de mélanger des billes de concentrations très hétérogènes. L'accrochage d'ECD-Iz1 se fait grâce à son extrémité biotinylée qui se fixe à la streptavidine de la bille (Figure 45 A). La concentration d'ECD-Iz1 sur les billes ne doit pas être trop élevée afin de laisser des sites streptavidine libres pour l'accrochage des billes sur les globules rouges, mais également pour favoriser la formation de lien uniques entre la bille et l'ovocyte. Afin de contrôler au mieux cette fonctionnalisation, un même nombre de billes a été incubées dans des solutions d'ECD-Iz1 de concentration variant de 29nM à 460 nM. Les ECD-Iz1 des billes fonctionnalisées ont ensuite été marqués par une sonde fluorescente permettant leur quantification par cytométrie de flux (Figure 45 B).

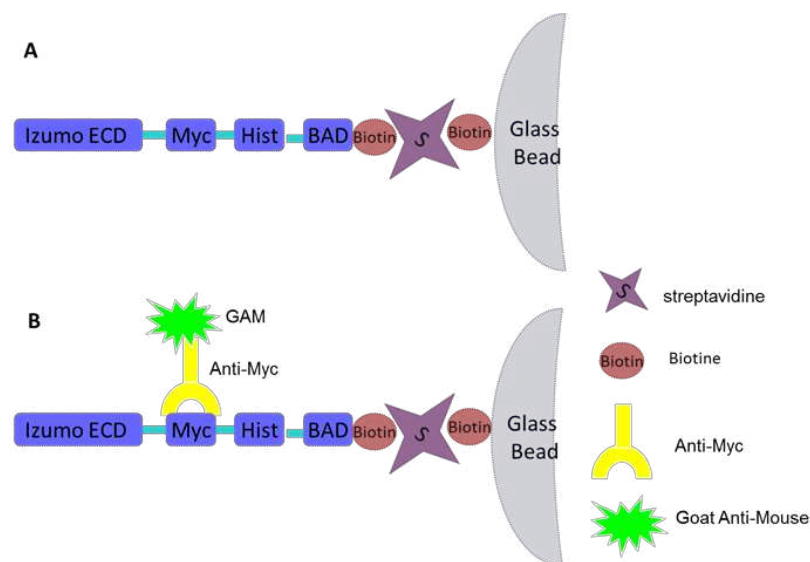


Figure 45: A / Schéma représentant l'ECD-Iz1 fixé à la bille de verre. ECD-Iz1 biotinylé fixe une streptavidine elle-même accrochée à la bille de verre (3 μm) biotinylée. B/ Schéma représentant l'immuno-marquage de l'ECD-Iz1 fixé à la bille de verre tel qu'analysé par le cytomètre. L'anticorps anti-Myc fixe l'étiquette Myc et est révélé par le secondaire Goat-anti-mouse Alexa-Fluor.

Le protocole détaillé de l'ensemble de cette procédure est donné ci-dessous :

a. La fonctionnalisation des billes

5 μ l d'une solution de billes (3 μ m diamètre), streptavidinées à la concentration de $70 \cdot 10^6$ billes/ μ l sont incubés dans la solution d'ECD-Iz1 de concentration choisie (29nM, 59nM, 115nM, 230nM, 460nM) pendant 30min à 4°C sous agitation circulaire lente. Les billes sont ensuite rincées trois fois avec 1ml de PBS 1x contenant de la BSA à 1/1000 (centrifugation à 6000 g pendant 4min) pour éliminer la protéine non fixée.

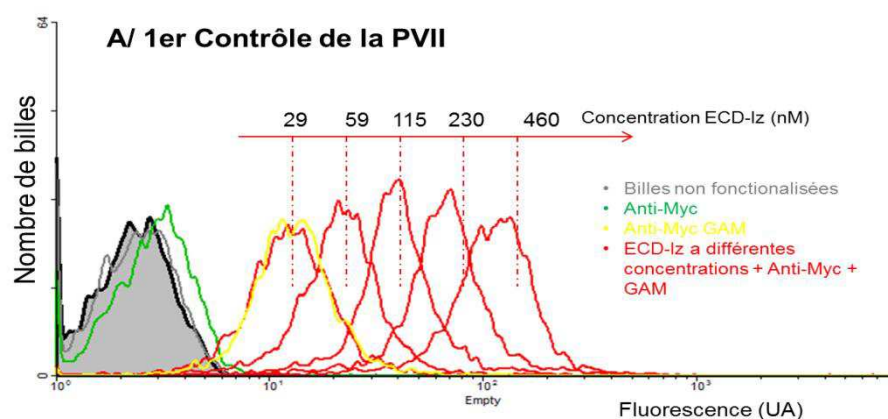
b. Révélation de la protéine recombinante et analyse par cytométrie de flux

La révélation de la protéine recombinante se fait par incubation dans 100 μ l de solution d'anti-Myc dilué au 1/100ème dans du PBS 1x avec BSA à 1/1000 pendant 30 min à 4°C sous agitation circulaire lente. L'excès d'anti-Myc est éliminé par une série de trois rinçages avec 1ml de PBS 1x avec BSA à 1/1000 (4 min à 6000g). Les billes sont ensuite incubées 30 min à 4°C sur roue avec le Goat-anti-mouse Alexa-Fluor au 1/50ème PBS 1x avec BSA à 1/1000. Après rinçage les protéines sont re-suspendues pour analyse au cytomètre de flux.

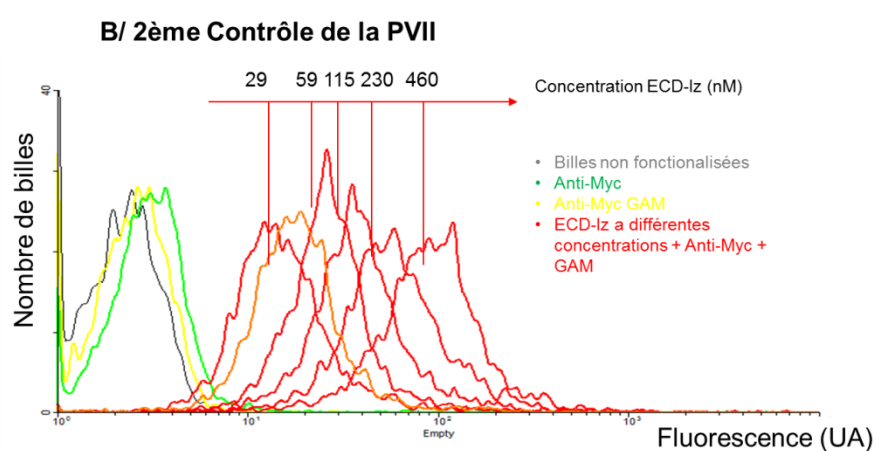
L'analyse des spectres de fluorescence a été très efficace pour déterminer le degré de pureté des protéines avec laquelle nous allons travailler. Deux exemples sont donnés (Figure 46 A, B et C) :

- Le premier concerne la purification PVII (Figure 46 A et B) : les spectres de fluorescence présentent des pics étroits, traduisant la présence de populations de billes fonctionnalisées de façon homogène pour une même solution d'incubation. L'intensité de fluorescence croît avec la concentration des solutions d'ECD-Iz1. Cette augmentation d'intensité témoigne de l'augmentation de la quantité d'ECD-Iz1 fixée aux billes. Le lot issu de cette purification est celui avec lequel nous avons mené l'ensemble de nos expériences BFP.
- Le second concerne la purification PVIII (Figure 46C) : les spectres de fluorescence donnent des courbes montrant des épaulements voire des courbes à deux pics, traduisant la présence de populations de billes très hétérogènes pour une même solution d'incubation. Nous avons également noté l'absence de corrélation entre la concentration en protéines de la solution dans laquelle nous avons fait incuber les billes et la densité de protéines liées aux billes. Un contrôle de la biotinylation des protéines issues de la purification PVIII a révélé un défaut de biotinylation. Ce lot de protéines a donc été écarté.

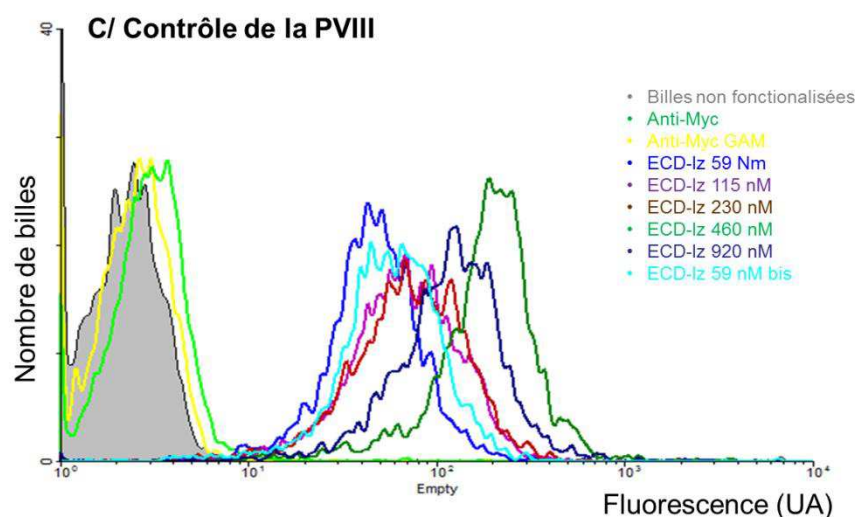
Figure 46: Spectres obtenus par cytométrie pour la purification PVII et PVIII.



A/ 1er test : Les spectres de fluorescence sont étroits traduisant des populations de billes homogènes. La densité de protéines à la surface des billes varie linéairement avec la concentration de la solution de fonctionnalisation et un plateau est obtenu à 115nM.



B/ 2ème test : La fonctionnalisation est reproductible.



C/ Résultats de la cytométrie obtenus pour la purification PVIII. Les spectres de fluorescence sont épaulés traduisant la présence de populations de billes hétérogènes. On note aussi l'absence de corrélation entre la concentration de la solution de fonctionnalisation et la densité de protéines recombinantes liées à la surface des billes.

Tous les lots antérieurs à la purification PVII ont dû également être écartés car lors de leur décongélation ils présentaient des signes d'agrégation importants. Cette agrégation a pu être attribuée soit à une dénaturation de la protéine lors des décongelations répétées, soit à une mauvaise conformation lors de la synthèse par les cellules de la lignée HEK 293F, bien que certaines des purifications suivantes aient été correctes. Pour limiter le risque de travailler avec une protéine dénaturée et/ou agrégée, nous avons fractionné la purification PVII en différents aliquotes et nous avons procédé à une nouvelle fonctionnalisation à partir d'un nouvel aliquote de protéines avant chaque expérience.

Au final, ce protocole de fonctionnalisation des billes nous a permis d'obtenir des billes homogènes en concentration de protéines liées à la surface. Ces fonctionnalisations homogènes et reproductibles ont permis l'utilisation de la protéine issue de la purification PVII pour effectuer les expériences de BFP.

Chapitre 2 / Le Biomembrane Force Probe

1. Le Principe

Le BFP est un outil de micromanipulation par micropipettes développé par Evan Evans dans les années 1990 (Evans E ; 1998) qui permet de sonder des liens à l'échelle de la molécule unique. Sa sensibilité est de l'ordre du pN et peut mesurer des interactions allant jusqu'à 1 nN. C'est un outil adapté à notre problématique car il permet de sonder l'interaction ligand-récepteur que peut développer ECD-Iz1 avec un partenaire ovocytaire. Son principe est le suivant. Un globule rouge est utilisé comme dynamomètre pour mesurer la force de rupture d'un lien. Le globule-ressort est maintenu dans une micropipette par aspiration contrôlée. Sa raideur k est proportionnelle à sa tension qui dépend elle-même de l'aspiration. Elle peut être variée sur trois ordres de grandeur. Une bille fonctionnalisée avec la molécule d'intérêt (ici ECD-Iz1) est collée au globule rouge (Figure 47). La sonde ainsi formée est mise en contact de façon répétée et automatisée par translation de la pipette avec le l'objet à sonder (ici l'ovocyte dépellucidé) lors de cycles approche-contact-séparation à une vitesse contrôlée. Chaque cycle permet d'obtenir une courbe force/distance. Si un lien s'est formé, la force de traction est mesurée jusqu'à la rupture de la liaison. La densité de molécules sur la bille est choisie suffisamment faible pour que la probabilité de former un lien au cours d'un contact soit de l'ordre de 10 %. Cette configuration permet de s'assurer que plus de 90% des cas d'adhésion impliquent une liaison unique. En pratique, l'interaction s'établissant entre la bille et l'ovocyte est obtenue par la mesure de la déformation Δx du globule rouge au moyen d'un logiciel de suivi de bille. Les distributions de forces de rupture $F = k \Delta x_{\max}$ obtenues seront la signature du potentiel d'interaction entre l'ECD-Iz1 et son partenaire ovocytaire. Le principe du BFP est reporté sur la figure 47.

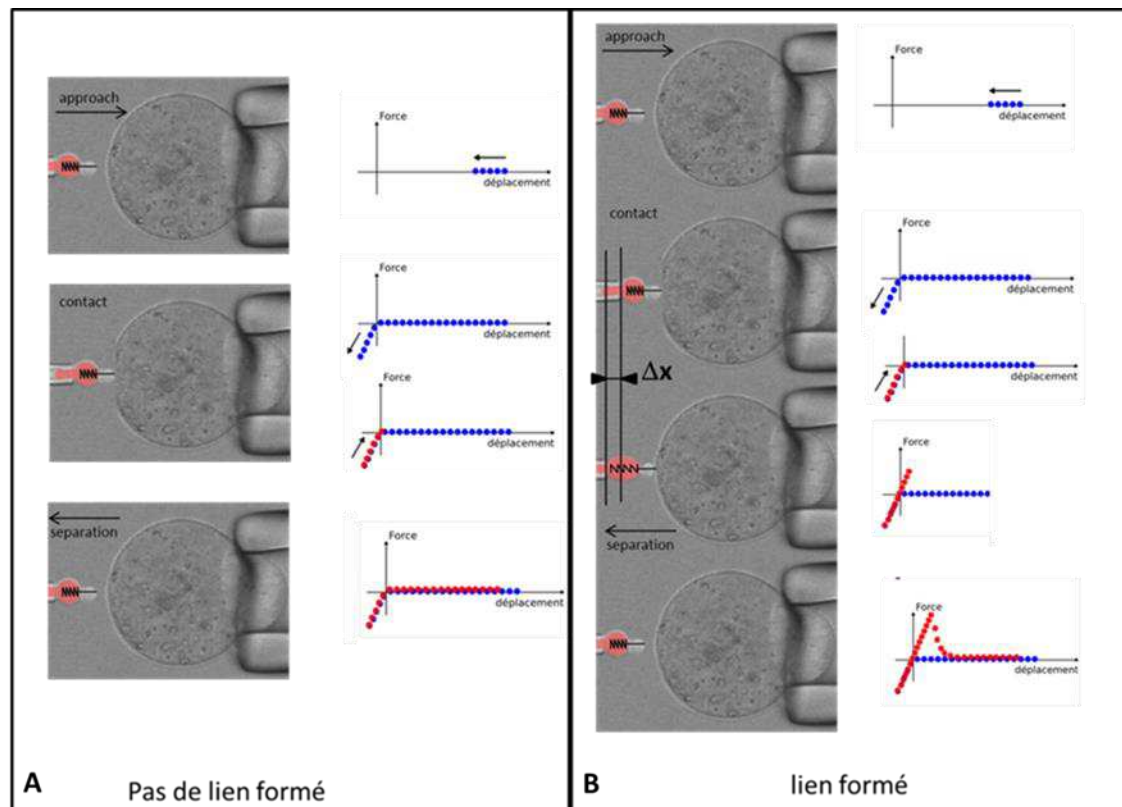


Figure 47 : Principe du BFP. Les pipettes qui maintiennent la sonde et l'ovocyte sont alignées et la sonde fait face à l'ovocyte. La courbe force-distance est également représentée pour un cycle "approche-contact-séparation" entre la bille et l'ovocyte : en bleu l'approche, en rouge la séparation. A/ Absence de formation de lien : il n'y a pas de déformation du ressort la force F est donc nulle. Lors du contact le ressort est comprimé $F = k\Delta x$ est négative. Lorsque la sonde est séparée de l'ovocyte, F redevient nulle. B/ Dans le cas de la création d'un lien : lors de l'approche la force F est nulle comme décrit précédemment. F est négative lors du contact. Lors de la séparation un lien est créé et le globule rouge s'allonge $F = k\Delta x$ est positive. La force de rupture $F_{max} = k \Delta x_{max}$ est la force au moment de la rupture du lien.

2. Le dispositif expérimental

La chambre expérimentale est constituée d'une boîte de Pétri, dans laquelle sont déposées 2 gouttes de 30 μ l de milieu M2 contenant 3% de BSA. Les ovocytes sont déposés dans la première goutte. Les globules rouges et les billes fonctionnalisées avec ECD-Iz1 ou les billes contrôles sont déposées dans la seconde goutte. Le tout est recouvert par de l'huile Medicult afin d'éviter l'évaporation des gouttes. Trois pipettes sont nécessaires à l'expérience (Figure 48 A). Les micropipettes qui maintiennent l'ovocyte et le globule rouge ont été décrites dans la 2ème partie au chapitre 3. La troisième pipette, installée perpendiculairement aux deux premières permet d'aspirer la bille de verre fonctionnalisée et de la fixer de façon précise sur le globule rouge de façon à avoir un bon alignement pipette-globule rouge-bille. Une fois la sonde formée, elle est transférée dans la goutte contenant les ovocytes. Pour cela, l'extrémité de la pipette tenant la sonde est introduite dans

la pipette de contention remplie de M2. Ainsi protégée, la sonde peut traverser le volume d'huile séparant les 2 gouttes (Figure 48 B).

Les pipettes maintenant l'ovocyte et la sonde sont positionnées en vis-à-vis de façon à ce que l'ensemble sonde-ovocyte-pipettes soit aligné. La position des réservoirs contrôlant l'aspiration dans ces deux pipettes est ajustée. Une aspiration faible de 5 Pa est choisie dans la pipette de contention afin de minimiser les contraintes imposées à l'ovocyte. Une aspiration de 250 Pa permettant de fixer la raideur du globule rouge-ressort à environ $125 \text{ pN}/\mu\text{m}$ est appliquée à la pipette maintenant la sonde. À ce stade les cycles d'approche-contact-séparation de la sonde sur l'ovocyte décrit dans la section précédente peuvent alors commencer, donnant lieu pour chaque cycle à une courbe de force (Figure 46). Pour chaque ovocyte, plusieurs billes sont testées et pour chaque couple ovocyte-sonde une série des 100 contacts est effectuée. Les nombreuses courbes obtenues (plus de 3000) sont analysées une à une et l'histogramme des forces de ruptures du lien peut être établi.

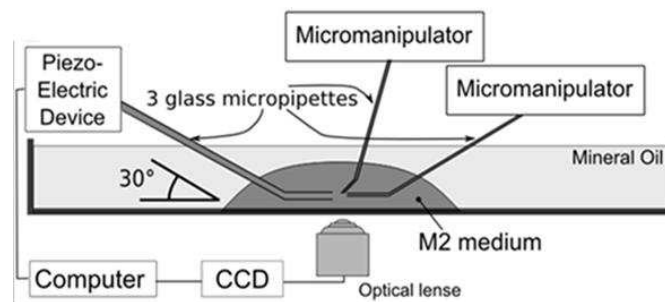


Figure 48 A: Schéma décrivant le dispositif expérimental. L'expérience se déroule dans une goutte de milieu tamponné sous huile à 37°C. Les trois micropipettes se font face et sont translatées au moyen de micromanipulateurs. La pipette de contention maintient l'ovocyte. La seconde pipette est celle qui maintient la sonde. La troisième pipette est une pipette qui va permettre la construction de la sonde.

B

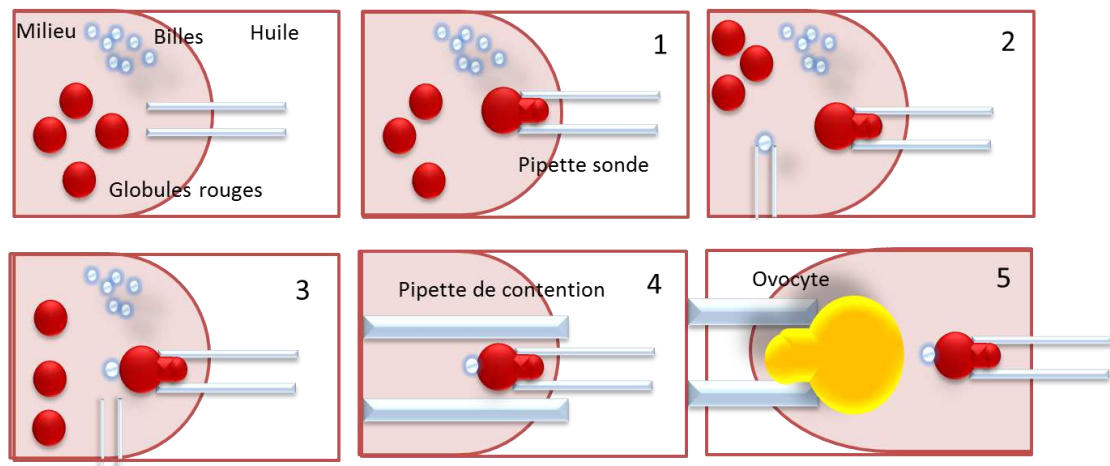


Figure 48 B : Les différentes étapes pour la fabrication de la sonde. Les globules rouges et les billes sont disposés dans la même goutte. L'ovocyte est dans une goutte différente. 1/ Le globule rouge est aspiré par la pipette de sonde. 2/ La bille est aspirée par une troisième pipette positionnée perpendiculairement. 3/ La bille est fixée sur le globule rouge de manière à avoir un bon alignement bille-globule rouge-sonde. 4/ La sonde ainsi fabriquée correctement alignée est transférée dans la pipette de contention dans la goutte de l'ovocyte.

Chapitre 3 / Résultats de l'approche moléculaire

Ce chapitre est dédié à l'ensemble des résultats obtenus par l'approche moléculaire utilisant l'ECD-Iz1. Deux types d'expériences ont été menés. D'une part, l'incubation des ovocytes dans des solutions contenant l'ECD-Iz1 et l'immuno-marquage. Ces expériences ont permis de tester la capacité d'Izumo1 à se lier aux ovocytes. Ces expériences seront présentées dans la première partie de ce chapitre. D'autre part, les expériences BFP ont ensuite permis de caractériser à l'échelle de la molécule unique le lien qu'Izumo1 est capable de former avec l'ovocyte. L'exposé de ces expériences constituera la deuxième partie de ce chapitre. Enfin une dernière partie sera consacrée à une synthèse des résultats et aux perspectives qui en découlent.

1. Incubation et immunofluorescence

Nous avons souhaité dans un premier temps savoir si l'ECD-Iz1 était capable de se lier à la membrane des ovocytes. Pour cela des ovocytes « sauvages » dépellucidés de la lignée de souris C57BL6/J ont été incubés dans une solution à 100µg/ml d'ECD-Iz1 non biotinylé pendant une heure à 37°C en milieu CO2 indépendant. Les ovocytes ont été rincés afin d'éliminer l'excédent d'ECD-Iz1 non fixés aux ovocytes puis les ovocytes ont été marqués par l'anticorps anti-Izumo1 monoclonal lui-même révélé par le secondaire Goat-anti-Rat Alexa-Fluor 488. À des fins de contrôle, des ovocytes sauvages ont été soumis au même protocole de marquage avec l'anticorps anti-Izumo1 monoclonal puis avec le secondaire Goat-anti-Rat Alexa-Fluor 488 ou avec le secondaire Goat-anti-Rat Alexa-Fluor 488 seul, sans incubation préalable avec l'ECD-Iz1.

L'observation en imagerie de fluorescence montre que tous les ovocytes qui ont été incubés avec l'ECD-Iz1 sont positifs à l'immuno-marquage (Figure 49) contrairement aux deux groupes contrôles qui ne montrent aucune fluorescence.

Ce résultat prouve que la protéine recombinante ECD-Iz1 est capable de se lier à la membrane plasmique de l'ovocyte et par conséquent que la membrane de l'ovocyte possède 1 ou plusieurs sites d'adhésion pour Izumo1.

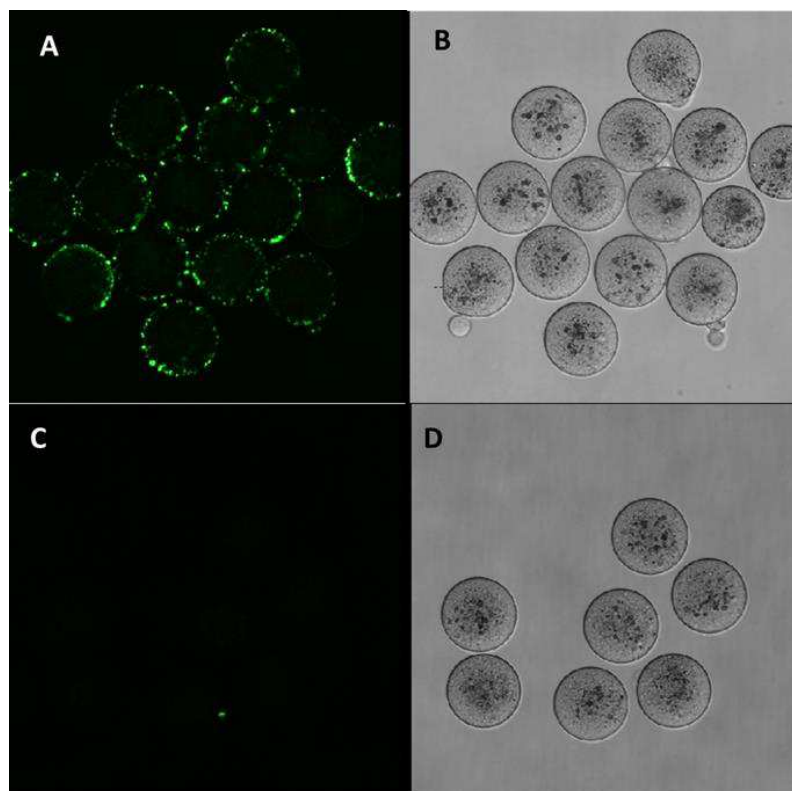


Figure 49: Révélation de l'immuno-marquage par imagerie confocale : à gauche (A et C) en fluorescence, à droite (B et D) en transmission. A/ Ovocytes incubés avec la protéine recombinante, rincés et révélés par l'anticorps primaire monoclonal Anti-Izumo1 et par l'anticorps secondaire Goat-anti-Rat Alexa-Fluor 488 : ECD-Iz1 se fixe aux ovocytes. C/ Les ovocytes du groupe contrôle, ne fixent pas l'anticorps anti-Izumo1 monoclonal.

2. Caractérisation du lien avec le BFP

Afin de tester si l'adhésion d'Izumo1 sur l'ovocyte est spécifique et de caractériser la robustesse du lien entre Izumo1 et son ou ses partenaire(s) ovocytaires, nous avons réalisé des expériences BFP telles que décrites dans le chapitre précédent.

Pour ces expériences, les billes streptavidinées ont été fonctionnalisées avec les *ECD-Iz1* issus de la purification PVII à la concentration de 59nM. Les billes contrôles étaient les mêmes billes streptavidinées sans fonctionnalisation. Dans les cycles d'approche-contact-séparation, le temps de contact entre la bille et l'ovocyte était environ 400 ms et la force maximale de compression à l'approche avait été fixée à 40 pN. Au total 3800 cycles impliquant 20 couples ovocyte-bille différents ont été réalisés avec les billes fonctionnalisées avec ECD-Iz1, et 1689 cycles impliquant 9 couples ont été effectués avec les billes témoins.

Deux types de courbes force-distance ont été obtenus. La figure 50 représente les profils d'interaction entre la bille et l'ovocyte quand on recule la pipette portant la sonde en appliquant une rampe de force croissant linéairement dans le temps (1000 pN/s). On voit que la force reste nulle

lorsqu'aucun lien ne s'est formé. En revanche si un lien est établi la force croît linéairement avec la distance de séparation jusqu'à rupture à la force F_{max} .

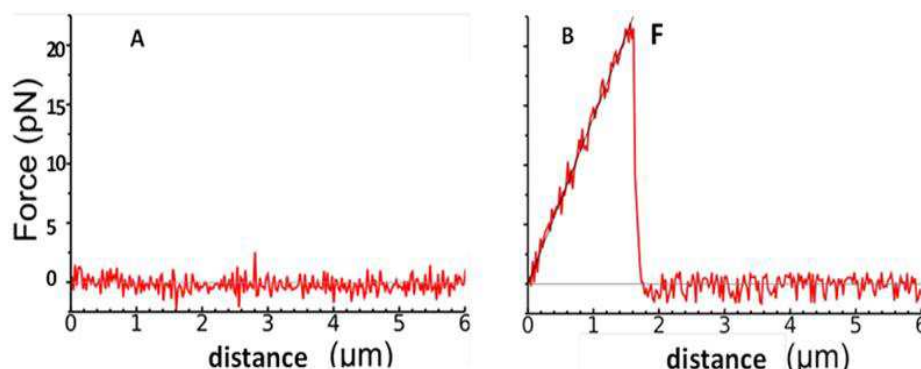


Figure 50: Courbes de force. A/ Absence de lien : la force est nulle. B/ Un lien entre Izumo1 et la membrane de l'ovocyte se crée. Le lien résiste à une rampe de force de traction jusqu'à ce que celle-ci parviennent à le rompre, la force d'interaction retombe alors brusquement à une valeur nulle.

Pour les billes recouvertes d'ECD-Iz1, le pourcentage de contacts donnant lieu à une adhésion est égal à 7% (Soit 257 liens pour 3782 tests). Ce pourcentage, inférieur à 10% est très satisfaisant puisqu'il garantit que la majorité des évènements obtenus correspond à la formation d'un lien unique. Dans le cas des billes contrôles, seuls 2% des contacts (1689 tests et 37 liens enregistrés) donnent lieu à une adhésion.

À partir de l'ensemble des forces de rupture obtenues, on peut tracer l'histogramme associé (Figure 51). Dans le cas des billes recouvertes d'ECD-Iz1, un pic unique bien défini est observé à 21 ± 1 pN (Figure 51), alors qu'aucun pic n'émerge de l'histogramme obtenu avec les billes témoin. Alors que ce dernier peut être associé à un bruit de fond d'adhésion non spécifique, le pic obtenu pour des billes recouvertes d'ECD-Iz1 suggère fortement l'unicité du contre partenaire d'Izumo1 sur l'ovocyte. D'un point de vue quantitatif, la valeur de 21 pN obtenue est cohérente avec la gamme standard de forces de rupture attendues pour un lien non-covalent impliquant des interactions de Van der Waals et des liaisons Hydrogène. À titre de comparaison, le lien streptavidine-biotine qui est considéré comme le lien non covalent possédant la plus forte robustesse rompt autour de 75 pN s'il est soumis à des conditions de traction (taux de charge) identiques.

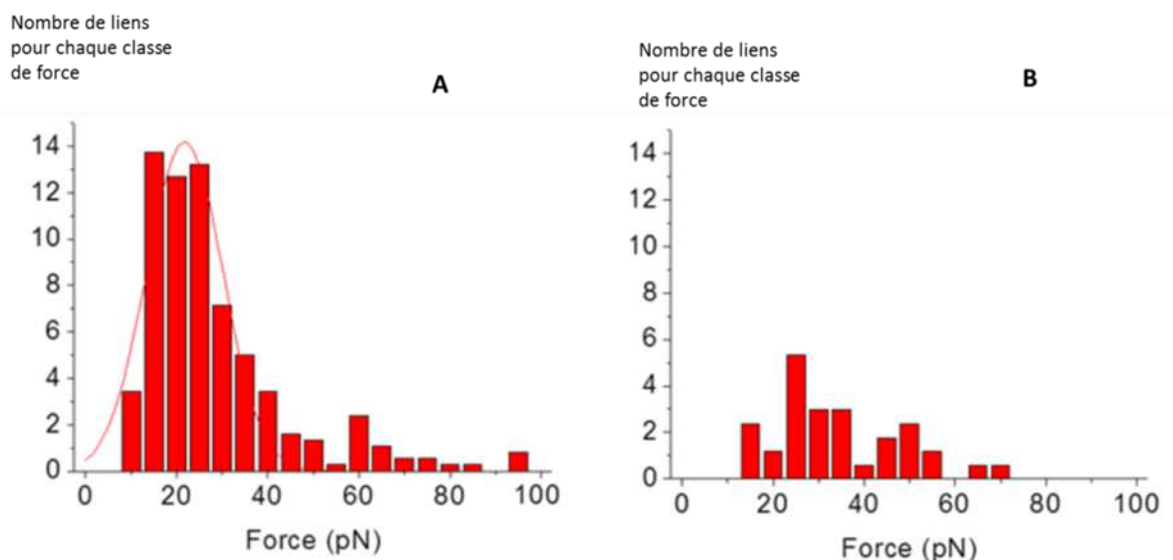


Figure 51: Distribution du nombre d'adhésions par classe de force dans le groupe de billes ECD-Iz1 de la purification PVII.

A/ Groupe test : Ovocytes de souris C57BL6/J sondés avec la protéine recombinante ECD-Iz1 (3782 Tests et 257 adhésions) : taux d'adhésion 6,8 % ; force 21 ± 1 pN.

B/ Groupe contrôle : Ovocytes de souris C57BL6/J sondés avec les billes streptavidinées (1689 Tests et 37 adhésions) : taux d'adhésion 2,2 %. La distribution des forces de rupture est très hétérogène traduisant la création de liens non spécifiques.

Notons que des tests réalisés avec des billes recouvertes d'ADAM2, une autre protéine de la membrane spermatique (Chapitre 3 de la 1ère partie), n'ont pas donné lieu à des événements d'adhésion. Cette observation renforce le caractère spécifique de l'interaction d'Izumo1 avec la membrane ovocytaire mis en évidence par les expériences impliquant les billes fonctionnalisées avec ECD-Iz1.

Conclusion et perspectives sur l'approche moléculaire

Les résultats obtenus par l'approche moléculaire confirment ceux que nous avons obtenus par l'approche cellulaire tout en les précisant quantitativement. Nous savons désormais qu'Izumo1 possède un partenaire à la membrane de l'ovocyte avec lequel il interagit pour créer de l'adhésion. Par ailleurs, et même si ce résultat était attendu, cette interaction en trans est développée par la portion extracellulaire de la protéine. Ce résultat est en accord avec différents travaux montrant l'inhibition de la fécondation par des anticorps bloquant Izumo1 dirigés contre le domaine extracellulaire (Kawai et al. 1994; Naz 2008; Xing et al. 2011).

Ce travail apporte des réponses mais suscite également des questions. On peut notamment se demander quelle partie du domaine extracellulaire est impliquée dans cette adhésion? Il peut s'agir de la partie N-terminale du domaine extracellulaire qui correspond à la partie Izumo à proprement parler, ou du domaine immunoglobuline. Les domaines immunoglobuline sont souvent impliqués dans des interactions avec d'autres molécules en cis comme en trans. Beaucoup d'anticorps reconnaissant les antigènes portés par les cellules sont des immunoglobulines. Une façon de tenter de répondre à cette question serait de produire des protéines présentant des mutations ou des troncatures dans l'un ou l'autre de ces domaines et d'analyser par une approche similaire leurs interactions avec l'ovocyte.

5ème partie / Les partenaires d'Izumo1 en intra et extracellulaire

Notre travail a montré pour la première fois qu'Izumo1 était impliquée dès l'étape d'adhésion de l'interaction gamétique. Elle induit une adhésion forte et stable dès les premières secondes de contact en se liant spécifiquement à une molécule ou complexe moléculaire largement exprimé par la membrane de l'ovocyte. Cette molécule partenaire en trans d'Izumo1 est encore à trouver. CD9 étant l'autre protéine reconnue comme indispensable dans le processus d'interaction gamétique, nous avons testé l'éventualité que CD9 soit impliqué dans l'adhésion cellulaire créée par Izumo1, soit en tant que récepteur direct d'Izumo1, soit en tant que partenaire de ce récepteur. La stratégie mise en place et les résultats associés seront présentés dans le chapitre 1.

Par ailleurs, Izumo1 étant une protéine d'adhésion, et les protéines d'adhésion interagissant souvent avec le cytosquelette, comme nous l'avons vu au second chapitre de la première partie, nous nous sommes interrogés sur la possible interaction qu'Izumo1 pouvait développer par sa terminaison cytosolique avec le cytosquelette. Les expériences explorant cette hypothèse sont exposées au chapitre 2.

Chapitre 1/ Interactions par le domaine extracellulaire : le partenaire d'Izumo1 sur l'ovocyte est-il la tétraspanine CD9 ou une protéine partenaire membranaire de CD9 ?

La tétraspanine CD9 (voir partie 1, chapitre 2, section 2.a.i) est une protéine capable d'organiser à la membrane des cellules des complexes moléculaires (Boucheix & Rubinstein 2001). En particulier, il a été montré que CD9 pouvait interagir avec des protéines de la Superfamille des Immunoglobulines (Levy & Shoham 2005; Charrin et al. 2003; Le Naour et al. 2004; Stipp et al. 2001; He et al. 2009). A la surface de l'ovocyte les CD9 organiseraient des sites d'adhésion propices à la fusion, permettant de stabiliser le spermatozoïde plaqué à l'ovocyte, ce qui n'est pas le cas en l'absence de CD9 (Jégou et al. 2011). Mais il a également été démontré que CD9 pouvait développer des interactions en Trans et constituer un récepteur partenaire, entre autres, des protéines de la Superfamille des Immunoglobulines (Ellerman et al. 2009; Waterhouse et al. 2002). Nous avons voulu explorer les deux hypothèses suivantes :

- la tétraspanine CD9 est le récepteur d'Izumo1.
- le récepteur d'Izumo1 fait partie des protéines interagissant en cis avec la tétraspanine CD9.

1. La tétraspanine CD9 est-elle la molécule partenaire d'Izumo1 ?

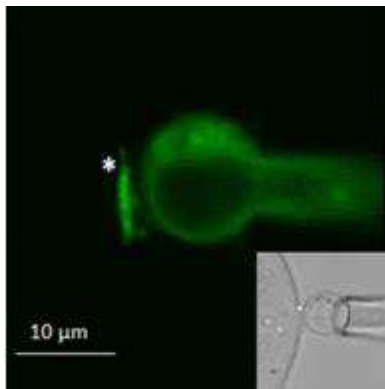
Afin de déterminer si CD9 est le récepteur d'Izumo1 sur l'ovocyte, nous avons sondé l'interaction entre des ovocytes CD9 -/- (ovocytes provenant de souris KO en CD9, ces souris sont décrites dans le chapitre 1 de la deuxième partie) et des cellules K562-Izumo1-EGFP par la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale selon le même schéma expérimental que celui décrit dans le 3ème chapitre de la 3ème partie. Le but de ces expériences était de tester l'adhésion en l'absence de la tétraspanine CD9.

Les ovocytes de la lignée CD9 KO ont été préparés selon le protocole décrit en chapitre 1 de la 2ème partie. Les tests d'adhésion ont été menés avec les cellules K562-Izumo1-EGFP transfectées transitoirement (selon le protocole en Annexe 3) par la technique de micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale. Les images ont été analysées par le logiciel Image J tel que décrit dans le chapitre 3 de la 3ème partie.

Qualitativement, nos expériences montrent que les cellules K562 exprimant Izumo1 se comportent de la même façon avec les ovocytes CD9 KO qu'avec les ovocytes sauvages. Les cellules adhèrent aux ovocytes, cette adhésion est forte entraînant une importante déformation de la cellule et de l'ovocyte ainsi que la rupture de la membrane cellulaire lors de la séparation des cellules.

Izumo1-EGFP est également recruté au niveau de la zone de contact (Figure 52). La tétraspanine CD9 n'est donc pas la protéine à laquelle Izumo1 se lie car même en son absence la cellule K562 exprimant Izumo1 adhère à l'ovocyte.

D'un point de vue quantitatif, il semble que la cinétique de recrutement d'Izumo1 soit plus rapide en l'absence de CD9. En effet, la saturation de la zone de contact semble être atteinte au bout de 10 min plutôt que 20 min pour les ovocytes sauvages. Ces résultats doivent cependant être complétés par des expériences qui permettent une analyse précise et détaillée de toute la zone de contact (comme effectué pour les résultats présentés partie 3 chapitre 3 section 2b). Si elle se trouvait confirmée, cette différence de cinétique serait une indication forte de l'implication de CD9 en tant que partenaire du récepteur d'Izumo1.



*Figure 52 : La cellule exprimant Izumo1-EGFP adhère à l'ovocyte. Il existe une intensification de la fluorescence au niveau de la zone de contact indiquée par * traduisant un recrutement en protéine.*

2. Le partenaire d'Izumo1 est-il une protéine partenaire de CD9 ?

a. La tétraspanine CD81 ?

La tétraspanine CD81 est un partenaire membranaire de CD9 (Rubinstein, Ziyat, Prenant, et al. 2006) et est également impliquée dans fertilité. En effet, le double KO CD81 et CD9 entraîne une stérilité totale suggérant une interaction entre ces deux protéines (Rubinstein, Ziyat, Prenant, et al. 2006; Ziyat et al. 2006; Rubinstein, Ziyat, Wolf, et al. 2006). Nous avons voulu explorer la possibilité que la tétraspanine CD81 puisse être le récepteur d'Izumo1.

Nous avons dans un premier temps testé l'adhésion entre les cellules exprimant Izumo1 exogène et des ovocytes « sauvages » incubés avec des anticorps anti-CD81 bloquants. Nous avons ensuite testé l'adhésion les cellules exprimant Izumo1 exogène et des ovocytes CD9 KO également incubés avec des anticorps anti-CD81 bloquants, l'idée étant de se rapprocher au plus d'une situation de

double KO et d'inhiber à la fois toute activité d'organisation membranaire par CD9 et une éventuelle activité de CD81 en trans.

Les ovocytes sauvages et les ovocytes CD9 KO ont été incubés avec les anticorps anti-CD81 bloquants pendant une heure à 37°C dans du PBS 1x à 1% de BSA sous 5% de CO₂. Les ovocytes ont ensuite été rincés. Les anticorps anti-CD81 ont été révélés par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 et les observations ont été faites en imagerie confocale. Sur la figure 53 nous voyons que les anticorps sont bien révélés à la membrane des ovocytes, et qu'il n'y a pas de différence significative entre les marquages des ovocytes sauvages et CD9 KO préincubés avec l'anti-CD81.

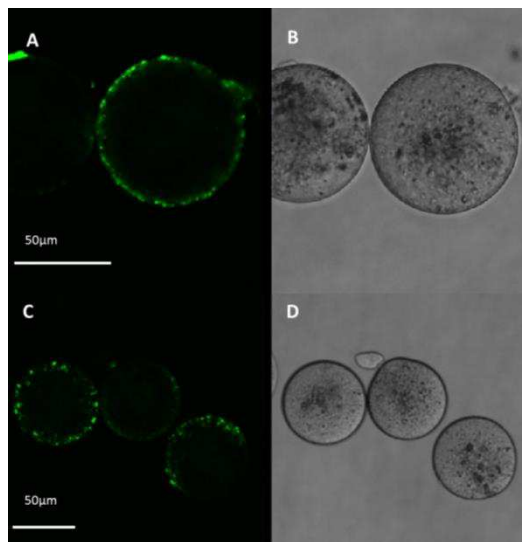


Figure 53 : Immuno-marquage des ovocytes par les anticorps anti-CD81 révélés par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488.

*A et B/ Ovocytes CD9 KO en fluorescence et en transmission.
C et D/ Ovocytes sauvages en fluorescence et en transmission.*

L'adhésion de cellules K562-Izumo1-RFP (rappelons que RFP n'est que cytoplasmique) avec ces ovocytes sauvages et CD9 KO préincubés avec les anticorps anti-CD81 a ensuite été évaluée. Les cellules continuent à adhérer aux ovocytes WT et KO CD9 même en présence d'anticorps bloquants dirigés contre la tétraspanine CD81.

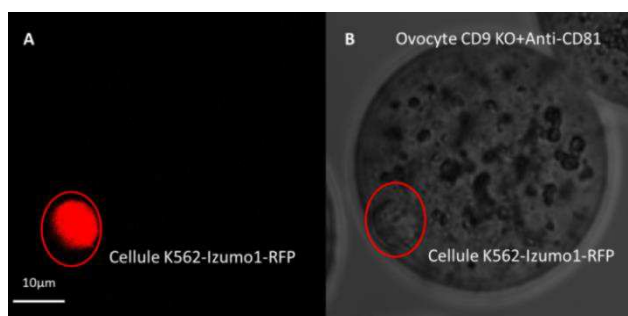


Figure 54 : Cellule K562-Izumo1-RFP adhérant à un ovocyte CD9 KO marqué par des anticorps anti-CD81 bloquants.

Ces observations montrent que ni la tétraspanine CD9 ni la tétraspanine CD81 ne sont les molécules partenaires d'Izumo1.

b. Le partenaire est-il une autre protéine partenaire de la tétraspanine CD9 ?

Afin de voir si le récepteur d'Izumo1 au niveau de la membrane de l'ovocyte est un partenaire en Cis de CD9 nous avons testé des ovocytes dont la tétraspanine CD9 porte une étiquette EGFP (les souris portant ce transgène sont décrites dans le chapitre 1 de la 2^{nde} partie). L'interaction a été sondée par la technique de mesure de force par micromanipulation de cellules couplée à l'imagerie confocale. L'objectif était d'évaluer le possible recrutement de la protéine CD9 au niveau de la zone de contact, à l'image de celui d'Izumo1.

Nous avons utilisé les cellules K562-Izumo1-RFP afin de pouvoir discriminer le recrutement provenant de la protéine CD9 de celui dû à la protéine exogène (Izumo1). L'expérience a été menée selon le même protocole que décrit partie 3 chapitre 3.

Nous avons observé un recrutement en CD9 au niveau de la zone de contact. Ce recrutement est moins important que celui d'Izumo1 et ne devient détectable qu'au bout de 10 minutes de contact. Cependant, la protéine CD9 est dès le départ très exprimée à la membrane comme le montrent les images de la figure 55. Ce délai de recrutement au niveau de la zone de contact pourrait s'expliquer par le fait qu'Izumo1 trouve son récepteur dès le contact en assez grande quantité, à la 10^{ème} minute tous les récepteurs présents sont saturés. Au-delà de ces 10 minutes de nouveaux récepteurs sont recrutés.

Ici aussi il serait judicieux de compléter les expériences et les analyses de recrutement en fluorescence afin de voir si les plateaux de saturation en fluorescence pour CD9-EGFP et Izumo1 sont atteints en même temps ce qui indiquerait que la molécule récepteur d'Izumo1 est bien liée à la tétraspanine CD9.

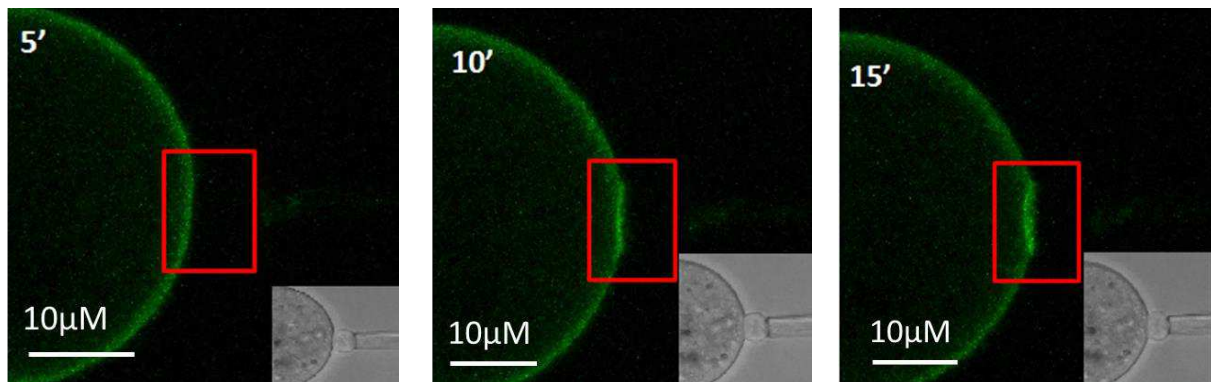


Figure 55 : Recrutement en CD9 au niveau de la zone de contact entre un ovocyte CD9-EGFP et une cellule K562-Izumo1-RFP. Le recrutement apparaît vers la 10ème minute et s'intensifie ; à la 15ème il est plus net.

3. Conclusion

Nos observations nous ont permis de mieux caractériser Izumo1. Celle-ci est une protéine d'adhésion qui, comme de nombreux membres de la Superfamille des Immunoglobulines, développe une interaction en trans avec un récepteur. Les liens qu'elle crée avec son partenaire en trans conduit à l'adhésion des cellules qui les portent. La tétraspanine CD9 est une protéine qui pourrait constituer le récepteur potentiel d'autant qu'elle développe des interactions avec une autre protéine de la Superfamille des Immunoglobulines (Ellerman et al. 2003). Nos observations permettent d'infirmar cette hypothèse : CD9 n'est pas le récepteur d'Izumo1. Nous avons également éliminé un autre candidat : la tétraspanine CD81. Toutefois, le recrutement de CD9 au cours de l'adhésion corrélé à celui d'Izumo1 suggère fortement que la molécule partenaire d'Izumo1 est associée en cis avec CD9. La saturation plus rapide en Izumo1 au niveau de la zone de contact en l'absence de CD9 renforce ce scénario. Ces expériences pourraient être continuées afin d'apporter une meilleure connaissance de la possible interaction entre la tétraspanine CD9 et le récepteur d'Izumo1.

Chapitre 2/ Interactions par le domaine cytosolique : Izumo1 est-elle liée au cytosquelette?

Comme mentionné en Introduction (Chapitre 2), plusieurs membres de la Superfamille des Immunoglobulines sont des protéines d'adhésion. Ces protéines sont des protéines transmembranaires qui permettent l'adhésion des cellules entre elles et à la matrice extra cellulaire. Elles réalisent des liaisons avec d'autres protéines de la même famille, « liaisons homophiles », ou avec d'autres molécules : des protéoglycanes de la matrice extracellulaire et des intégrines. Elles jouent un rôle important dans la transduction des signaux de stress mécanique extracellulaires vers le milieu intracellulaire et ce en interagissant avec le cytosquelette.

L'expérience présentée ici vise à mettre en évidence une éventuelle interaction entre Izumo1 et le cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau de fibres dont la partie la plus importante est constituée par l'actine.

1. Expériences d'inhibition de la polymérisation de l'actine

Afin d'étudier l'interaction entre l'actine et la portion cytosolique d'Izumo1, nous avons, dans un premier temps, traité les cellules K562-Izumo1-RFP à la latrunculine B. C'est une drogue (un macrolide) qui forme des complexes avec les monomères d'actine et inhibe sa polymérisation (Spector et al. 1989).

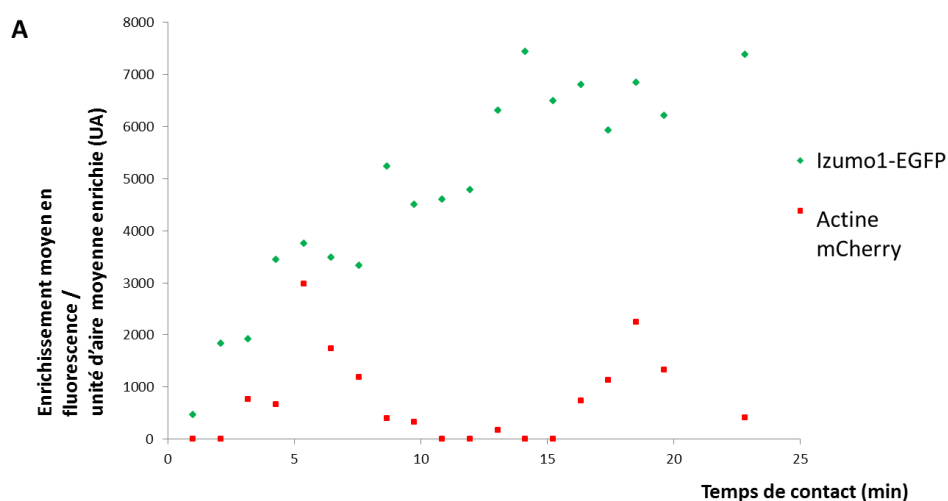
Nous avons incubés les cellules exprimant la protéine recombinante dans une solution à 500nM de latrunculine B pendant une heure dans du M2 à 3% de BSA à 37°C. Les cellules ont ensuite été rincées. L'adhésion avec les ovocytes a été testée par micromanipulation comme précédemment. Cependant, le traitement à la latrunculine ayant beaucoup fragilisé les cellules, elles se sont avérées difficiles à manipuler, leur membrane se rompant rapidement, parfois aussitôt après que la cellule a été attrapée par la micropipette. Nous avons donc eu recours à une stratégie alternative basée sur un marquage fluorescent de l'actine.

2. Expériences de marquage fluorescent de l'actine

Le pDEST/LifeAct-mCherry-N1 (Annexe 2) est un plasmide qui fait exprimer aux filaments d'actine (actine F) une étiquette mCherry qui émet dans le rouge. Une cellule transfectée avec ce plasmide exprime donc une actine F dont la répartition peut être directement imagée en confocal dans le temps. Dans notre cas il est intéressant d'observer l'évolution de la répartition de l'actine au fur et à mesure du recrutement d'Izumo1 dans la zone de contact cellule/ovocyte, afin de voir une éventuelle corrélation. Les cellules K562 ont été co-transfectées par les plasmides plzumo1-EGFP et pLifeAct-mCherry dans une proportion 3 pour 1 pour ne pas avoir une expression trop importante de

l'actine portant l'étiquette fluorescente par rapport à Izumo1. La transfection a été faite selon le protocole donné en annexe 3. Le rendement de la co-transfection est extrêmement faible. Moins de 1% des cellules expriment à la fois Izumo1-EGFP et l'actine F mCherry. Pour la première fois, des cellules exprimant manifestement Izumo1-EGFP (car vertes) n'adhéraient pas aux ovocytes suggérant un mauvais adressage d'Izumo1 à la membrane et/ou une mauvaise conformation de la protéine. Un seul test d'adhésion a pu être mené par micromanipulation. En effet, 9 cellules exprimant les deux protéines exogènes ont été testées. Seulement deux ont adhéré, mais le recrutement de l'actine n'a été observé que sur une seule de ces deux cellules. Les acquisitions ont été faites par imagerie confocale. Les analyses ont été faites avec le Logiciel Image J en utilisant le même protocole d'analyse que celui décrit dans le 3ème chapitre de la 3ème partie.

Nous observons le recrutement habituel en Izumo1 au niveau de la zone de contact avec un plateau qui débute autour de la 15^{ème} minute de temps de contact. Par ailleurs nous avons observé 2 pics d'expression de l'actine dans la zone de contact. Contrairement à Izumo1 ou même CD9 sur l'ovocyte, cette augmentation du taux d'actine dans la zone de contact semble transitoire. Un premier pic apparaît à la 6ème minute de contact puis disparaît, un autre apparaît à la 17ème minute et disparaît à son tour (Figure 48 A et B). Il se trouve que dans le test mené, ces deux pics d'actine se produisent à deux moments particuliers : le premier pic à la 6ème min fait suite à la fin de l'extension de l'aire de contact effective, le second fait suite à la saturation de cette dernière en protéine. Néanmoins d'autres expériences devront être réalisées pour confirmer ou infirmer le caractère systématique de cette observation.



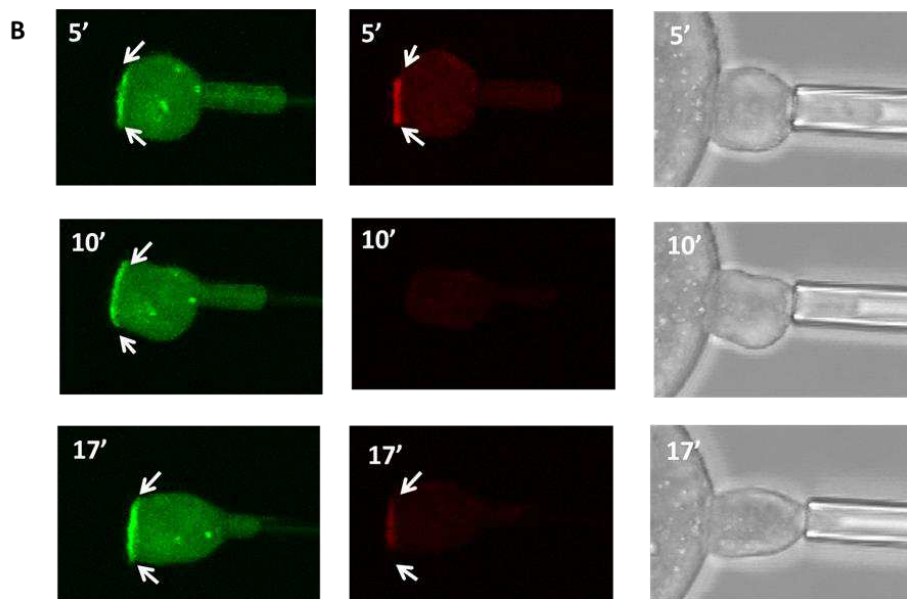


Figure 48 : Recrutement en Izumo1 et en actine au niveau de la zone de contact. L'enrichissement moyen en fluorescence par unité d'aire moyenne augmente pour Izumo1 pour atteindre un plateau à la 15ème minute de temps de contact. L'enrichissement en actine indiqué par * présente quant à lui en deux pics à la 6ème minute et un 2nd à la 18ème minute.

3. Conclusion

Ces observations nous permettent d'envisager un lien possible entre l'actine et Izumo1. Par exemple, elles pourraient suggérer qu'Izumo1, au niveau de la zone de contact, transducte un signal extracellulaire et active ainsi l'actine F qui se voit recrutée également au niveau de cette région. L'actine F pourrait ensuite elle-même entraîner l'activation d'une protéine qui pourrait jouer un rôle dans la fusion. Cette expérience n'a pu être refaite compte tenu de la difficulté d'obtenir une Co-expression des deux vecteurs par transfection transitoire. Il serait néanmoins intéressant d'explorer plus avant la possibilité d'une interaction entre Izumo1 et le cytosquelette au moment du contact avec l'ovocyte.

6ème partie / Izumo1 impliquée au-delà de l'adhésion?

Le fait que les spermatozoïdes Izumo1 KO adhèrent à l'ovocyte sans fusionner (Inoue et al. 2005) d'une part et qu'Izumo1 se lie en Cis à d'autres protéines de la membrane spermatique d'autre part (Stein et al. 2006; Ellerman et al. 2009; Inoue et al. 2010b) laissent penser qu'Izumo1 est une protéine impliquée dans l'étape de fusion.

Nous avons exploré l'hypothèse qu'Izumo1 induise la fusion et ce indépendamment des autres protéines spermatiques. Les résultats de ces séries d'expériences seront exposés dans le premier chapitre. Nos observations nous ont permis de mettre en évidence deux phénomènes décrits lors de la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte. Le premier est le phénomène de trogocytose (Barraud-Lange, Naud-Barriant, Bomsel, et al. 2007; Miyado et al. 2008), ces observations seront décrites dans le second chapitre. Le deuxième est un phénomène proche de la phagocytose observée lors de l'internalisation de la tête du spermatozoïde phagocytose (Yanagimashi R 1994 ; Chen & Sthanathan 1986 ; Sthanathan 1993) et observée par Bronson (Bronson 1998; Bronson & Fusi 1990). Les résultats de ces observations feront l'objet du troisième chapitre de cette partie.

Chapitre 1/ Izumo1 induit-elle une fusion ou hémi-fusion des membranes cellulaires ?

Nous avons démontré qu'Izumo1 est une protéine d'adhésion. Mais la littérature nous dit que sans Izumo1 la fusion ne peut se produire (Inoue et al. 2005). Lors de la fusion, les bicouches qui composent la membrane des 2 cellules en contact n'en font plus qu'une. Lors d'une hémifusion, seules les couches externes des membranes des 2 cellules communiquent. L'hémifusion peut constituer la première étape de la fusion. Nous avons alors voulu tester l'hypothèse que la forte adhésion induite par Izumo1 puisse mener à la fusion ou à l'hémifusion sans intervention d'autres protéines spermatiques.

Pour mener cette étude, nous avons réalisé 4 tests différents :

1. Les expériences d'adhésion ovocytes-cellules K562-Izumo1-RFP

La RFP exogène est d'expression intra-cytoplasmique. Dans le cas d'une fusion elle serait observée en fluorescence dans le cytoplasme de l'ovocyte autour de la zone de contact. Aucune des expériences que nous avons menées ne nous a permis de mettre en évidence le passage de la RFP dans le cytoplasme de l'ovocyte (Figure 49).

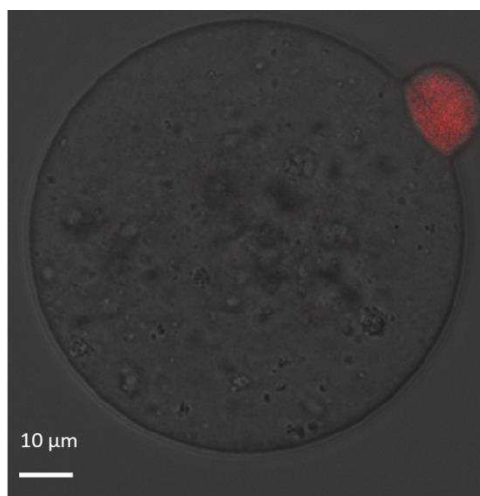


Figure 49 : Cellule K562-Izumo1-RFP adhérant à un ovocyte; il n'y a pas de passage de la RFP dans le cytoplasme.

2. Les expériences d'adhésion ovocytes marqués au Hoechst-cellules K562-Izumo1-RFP

Pour mener cette étude nous avons repris le principe de révélation de la fusion par marquage au Hoechst exposé au 1er chapitre de la 2 me partie. Un ovocyte préalablement incubé dans du Hoechst puis rincé est micromanipul  au contact d'une cellule K562-Izumo1. L'évolution d'Izumo1

dans la zone de contact ainsi que l'éventuelle apparition de Hoechst dans le noyau de cellule, signe que la fusion des membranes a eu lieu, sont suivis en microscopie confocale.

Nous avons observé qu'en dépit d'une adhésion forte et durable, le Hoechst ne se fixe pas sur le noyau de la cellule. Celle-ci adhère à l'ovocyte mais ne fusionne pas (Figure 50).

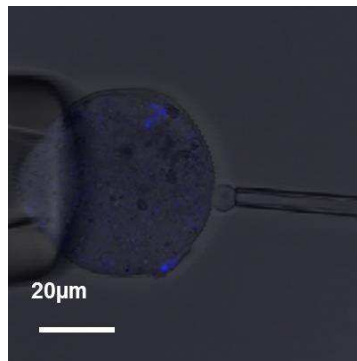


Figure 50: Cellule K562-Izumo1-EGFP après adhésion avec un ovocyte préincubé au Hoechst. Le noyau de l'ovocyte est marqué, celui de la cellule ne l'est pas. Il n'y a pas de fusion.

3. Les expériences d'adhésion ovocytes PKH-cellules K562-Izumo1-RFP

Nous avons marqué les membranes ovocytaires par du PKH27; fluorophore ayant une queue lipophile qui s'insère dans la membrane et la colore. Dans le cas d'une fusion ou hémifusion, la membrane cellulaire serait également marquée. Mais nos résultats n'ont rien montré de tel (Figure 52).

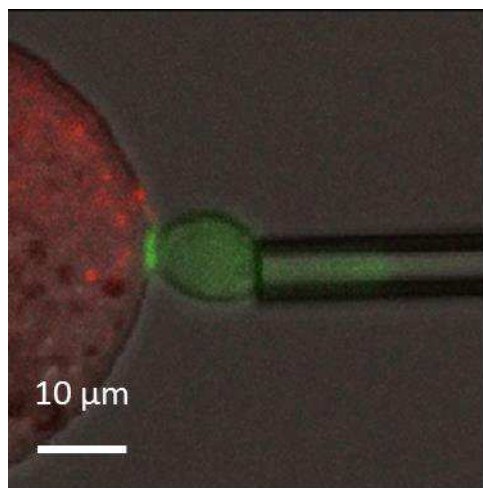


Figure 52: Cellule K562-Izumo1-RFP adhérent à un ovocyte marqué par le PKH 27. Il n'y a pas de passage du PKH à la membrane de la cellule. Il n'y a pas d'hémifusion.

4. Conclusion

Ces résultats nous permettent d'arriver par quatre expériences différentes à la conclusion qu'Izumo1 seule ne peut induire ni fusion ni hémifusion. Si elle est impliquée dans un processus de fusion, Izumo1 doit pouvoir interagir avec d'autres protéines de la membrane du spermatozoïde.

Chapitre 2/ Un échange de membrane ou « trogocytose » ?

La trogocytose est un phénomène décrit essentiellement dans la synapse immunologique et qui consiste en un transfert intercellulaire de molécules membranaires. Elle implique un rapprochement étroit des membranes. La trogocytose a été décrite pour la première fois dans les années 70 puis l'idée a été abandonnée jusqu'aux années 90 où, grâce à l'imagerie de fluorescence, Huang et al. ont pu montrer un transfert des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) portant une étiquette GFP d'une cellule présentatrice d'antigène vers des lymphocytes T cytotoxiques (Huang 1999). En 2001 l'équipe d'Hudrisier montre que les lymphocytes T cytotoxiques peuvent capturer des fragments de membrane de la cellule présentatrice d'antigène portant des protéines transmembranaires (Hudrisier et al. 2001).

La trogocytose a été évoquée pour la première fois dans l'interaction gamétique par l'équipe du Laboratoire de Biologie de la Reproduction Humaine de l'hôpital Cochin avec laquelle nous collaborons. Lange et al. montrent que le spermatozoïde capture des protéines CD9 par transfert de membrane ovocytaire et ce par un mécanisme proche de la trogocytose (Barraud-Lange, Naud-Barriant, Bomsel, et al. 2007); cet échange membranaire est déterminant pour la réussite de la fécondation ; en incubant des ovocytes CD9-/- avec les vésicules portant la protéine l'équipe de Miyado a montré un recouvrement de la fécondation (Miyado et al. 2008).

En réalisant les expériences d'adhésion entre les ovocytes marqués au PKH 67 et des cellules K562-Izumo1-RFP décrites au chapitre précédant, nous avons observé que sur certaines cellules laissées en contact environ une heure avec l'ovocyte la présence des domaines émettant en vert en fluorescence (Figure 53). Cette fluorescence traduit la capture de lipides ovocytaires marqués au PKH67 par la cellule.

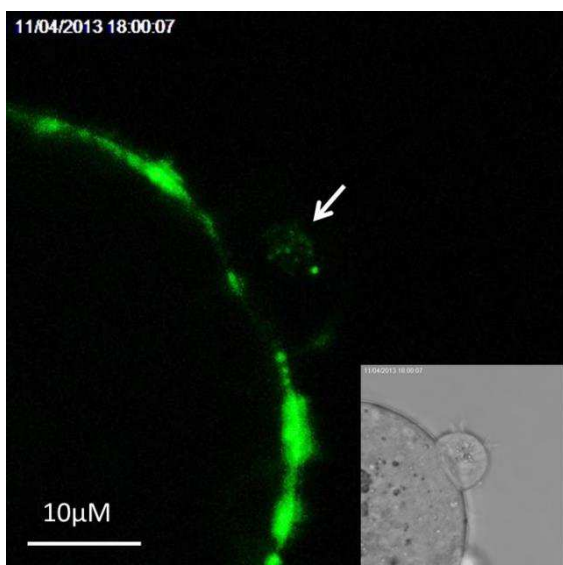


Figure 53 : Cellule K562-Izumo1-RFP adhérant à un ovocyte marqué par le PKH 67. Des lipides de la membrane de l'ovocyte sont capturés par la cellule évoquant un phénomène de trogocytose.

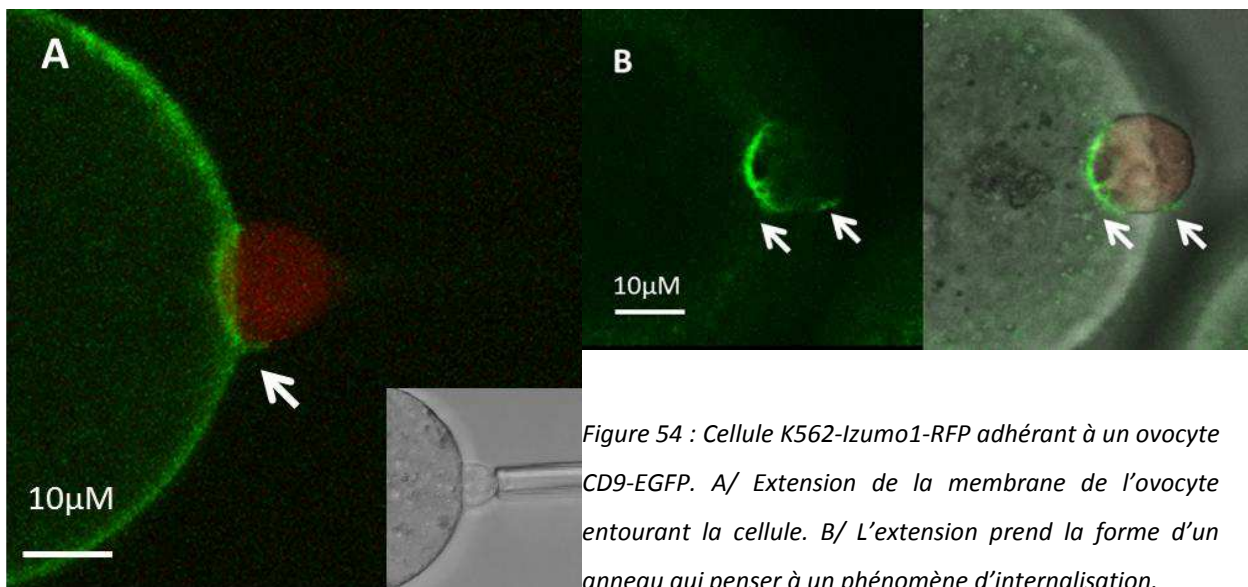
Conclusion

Nos observations ont permis de mettre en évidence un transfert de lipides de la membrane de l'ovocyte vers la membrane de la cellule exprimant Izumo1 rappelant fortement un phénomène de trogocytose observé dans le cas de l'interaction gamétique par deux équipes différentes (Barraud-Lange, Naud-Barriant, Bomsel, et al. 2007; Miyado et al. 2008). Cette observation soulève l'interrogation suivante : ce phénomène de trogocytose que nous avons vu est-il du uniquement à l'adhésion ovocyte-cellule ou existe-t-il un phénomène de reconnaissance ente l'ovocyte et la cellule exprimant la protéine exogène qui serait Izumo1 induit ? Des expériences complémentaires doivent être menées afin de mieux étudier cet échange membranaire elles seront exposées dans la partie conclusion et perspectives.

Chapitre 3/ Le spermatozoïde est-il internalisé par un phénomène proche de la phagocytose ?

Les images de microscopie électronique montrent que la fusion a lieu au niveau de la zone équatoriale tandis que la partie antérieure de la tête du spermatozoïde est internalisée par un mécanisme proche de la phagocytose (Yanagimashi R 1994 ; Chen & Sthananthan 1986 ; Sthananthan 1993). Izumo1 est présent au niveau de cette région équatoriale au moment où le spermatozoïde et l'ovocyte fusionnent. L'équipe d'Okabe a confirmé cette donnée par le suivi dynamique de spermatozoïdes dont l'Izumo1 porte une étiquette mCherry, en train de féconder des ovocytes portant un CD9-EGFP (Satouh et al. 2012). Elle a montré que les spermatozoïdes exprimant Izumo1 formaient une vésicule d'internalisation dans le cytoplasme de l'ovocyte par la partie antérieure de leur tête (cette donnée est discutée dans le chapitre discussion de la 3^{ème} partie de ce travail). Cette internalisation débute 5min après le contact et Izumo1 disparaît à la 20^{ème} minute.

Lors des expériences menées avec des ovocytes de la lignée CD9-EGFP avec des cellules exprimant Izumo1-RFP nous avons observé après une trentaine de minutes de contact un phénomène assez ressemblant à une internalisation. Nos résultats montrent que la membrane de l'ovocyte développe des extensions, et ce vers 12 minutes de contact et forme un anneau autour de la cellule K562-Izumo1-RFP (Figure 54).



Conclusion

Izumo1 ne semble pas avoir la possibilité d'induire l'ouverture d'un pore de fusion. Toutefois cette protéine semble impliquée au-delà de l'étape d'adhésion des gamètes. Nous avons observé un phénomène d'internalisation proche de la phagocytose évoquant l'internalisation de la partie antérieure de la tête du spermatozoïde se produisant lors de la fécondation. Ce phénomène d'internalisation implique-t-il une reconnaissance spécifique médiée par Izumo1 ? Il est intéressant de noter que ce phénomène se produise en présence d'Izumo1 mais nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer qu'il en dépend. Ici aussi des expériences complémentaires pourraient amener des éléments de réponse intéressants.

Conclusions et perspectives

Nos résultats montrent pour la première fois qu'Izumo1 est une protéine d'adhésion reconnaissant un récepteur spécifique sur la membrane de l'ovocyte. Ce récepteur est largement présent au niveau de la membrane de l'ovocyte et développe un lien avec Izumo1 dès les premières secondes de contact. Nous avons pu quantifier cette adhésion à l'échelle moléculaire et cellulaire et nos résultats montrent que c'est une adhésion forte et stable. Nous avons mis en évidence cette interaction par deux méthodes expérimentales différentes et au moyen de trois modèles cellulaires différents. Cette interaction est donc spécifique à Izumo1. Nos résultats ont également montré qu'Izumo1 est recruté au niveau de la zone de contact et ce dès les premières minutes. Ces arguments nous permettent d'avancer l'hypothèse qu'Izumo1 est une protéine d'adhésion générant une adhésion forte du spermatozoïde à l'ovocyte propice au à l'établissement du processus de fusion. Cette hypothèse est en accord avec les observations de l'équipe d'Okabe montrant que les seuls spermatozoïdes capables de fusionner sont ceux montrant une forte concentration d'Izumo1 dans la zone équatoriale (Satouh et al. 2012), cette zone étant celle par laquelle la fusion des gamètes se produit (Nagagimachi 1994 ; Chen Sthananthan 1986 ; Sthananthan 1993).

Nous avons pu également montrer que cette adhésion est développée par la portion extracellulaire de la protéine. Ce résultat est soutenu par différents travaux d'inhibition de la fécondation par des anticorps dirigés contre la portion extracellulaire de la protéine (Inoue et al. 2005; Naz 2008; Xing et al. 2011; Wang et al. 2009). Toutefois la portion du domaine extracellulaire impliquée dans cette adhésion n'est pas définie. Il peut s'agir de la partie N-terminale du domaine extracellulaire qui correspond à la partie Izumo à proprement parler, ou du domaine immunoglobuline. La génération de protéines recombinantes portant des troncatures ou des mutations ponctuelles de l'un ou l'autre de ces domaines et leur analyse par les mêmes approches que celles utilisées dans cette étude pourrait apporter une réponse.

Le récepteur d'Izumo1 sur l'ovocyte reste encore à trouver. Les expériences préliminaires que nous avons menées nous permettent d'affirmer avec certitude qu'elle n'est ni la tétraspanine CD9 ni la tétraspanine CD81 mais suggèrent tout de même l'implication de CD9 en tant que partenaire en Cis de ce récepteur. Ces expériences devront être continuées afin de confirmer et quantifier ces observations.

Izumo1 développe donc une interaction en Trans qui n'exclut cependant pas une interaction en Cis avec des protéines partenaires de la membrane spermatique, elles-mêmes impliquées dans les

étapes d'adhésion et/ou de fusion (Stein et al. 2006; Ellerman et al. 2009). La possibilité qu'Izumo1 joue à la fois le rôle de protéine d'adhésion et d'organisateur de protéines fusogènes est d'autant plus plausible que nous avons démontré que bien que sa présence soit indispensable à la fusion des gamètes, Izumo1 seule ne peut induire cette fusion.

Nos travaux ont également mis en évidence deux mécanismes membranaires pouvant jouer un rôle dans le processus fusion pour lesquels Izumo1 pourraient jouer un rôle actif.

Le premier est un transfert de lipides de la membrane de l'ovocyte vers la membrane de la cellule exprimant Izumo1 exogène rappelant fortement un processus de trogocytose. Ce phénomène a été observé entre le spermatozoïde et l'ovocyte, des protéines CD9 de la membrane spermatique ayant été retrouvées sur des spermatozoïdes ayant approché l'ovocyte (Barraud-Lange et al. 2007; K. Miyado et al. 2008). Le rôle éventuel d'Izumo1 dans ce processus de trogocytose reste cependant à être déterminé. On peut notamment imaginer que les liens formés entre Izumo1 et son récepteur puissent déclencher une signalisation induisant ce phénomène de trogocytose ? Une première expérience permettant de tester cette hypothèse serait d'incuber des ovocytes marqués au PKH 67 et de les faire adhérer à des cellules K562 sauvages (n'exprimant pas la protéine exogène Izumo1) par un autre moyen qu'Izumo1 (nous pouvons par exemple envisager une adhésion via un lien streptavidine biotine). Si un transfert de membrane était observé, il serait donc indépendant d'Izumo1. Dans le cas contraire, le rôle d'Izumo1 dans le processus de trogocytose serait confirmé. Une autre idée d'expérience serait d'incuber des ovocytes au PKH 26 (qui émet dans le rouge) et des cellules K562-Izumo1-EGFP : les fragments de membrane qui seront transférés sur la cellule apparaîtront en rouge et au cas où le récepteur d'Izumo1 y est présent nous pouvons envisager de voir un recrutement d'Izumo1 au niveau de la zone de contact. Il serait également envisageable de mener ces expériences avec des ovocytes CD9-EGFP pour vérifier si le CD9 est observé également sur les vésicules de trogocytose.

Le second mécanisme observé concerne des extensions de la membrane de l'ovocyte autour des cellules exprimant Izumo1. Elles suggèrent un début d'internalisation de la cellule ou à un phénomène de type phagocytose. Il est intéressant de noter que ce phénomène se produit en présence d'Izumo1 mais de nouveau nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer qu'il en dépend. Ce phénomène de pseudo phagocytose est observé lors de l'englobement de la partie antérieure de la tête du spermatozoïde par l'ovocyte (Yanagimashi R 1994 ; Chen & Sthanathan 1986 ; Sthanathan 1993). Bronson et ses collaborateurs ont observé en microscopie électronique des ovocytes de hamster fécondés par des spermatozoïdes humains (Bronson 1998). Ils ont noté un allongement des microvillosités autour de la zone équatoriale des spermatozoïdes au moment de

l'adhésion de ces derniers avec la membrane cytoplasmique de l'ovocyte. De plus, seuls les spermatozoïdes qui adhèrent aux microvillosités ovocytaires par leur zone équatoriale fusionnent avec l'ovocyte. Bronson et ses collaborateurs en concluent qu'il existe un phénomène de reconnaissance entre l'ovocyte et le spermatozoïde proche de la reconnaissance de la cellule présentatrice de l'antigène par le macrophage au moment de la phagocytose (Bronson & Fusi 1990). Nous pouvons envisager qu'Izumo1 joue un rôle dans cette reconnaissance entre le spermatozoïde et l'ovocyte. Des expériences complémentaires pourraient être menées afin de mieux caractériser ce phénomène. Nous pouvons par exemple induire une adhésion indépendante d'Izumo1 en incubant les cellules et les ovocytes à la biotine et en ajoutant la streptavidine dans le milieu et vérifier si ce phénomène d'enveloppement est Izumo1 dépendant. Okabe et ses collaborateurs ont montré que ce phénomène d'internalisation avait lieu environ 5 minutes après l'adhésion du spermatozoïde à la membrane ovocytaire et qu'Izumo1 est présent dans les vésicules d'Internalisation (Satouh et al. 2012). Nos observations montrent que les extensions de la membrane apparaissent aux alentours du temps de saturation de la zone de contact entre la cellule exprimant la protéine recombinante et l'ovocyte. Izumo1 pourrait être impliquée au-delà de l'adhésion observée au niveau de la zone équatoriale en jouant un rôle dans l'internalisation de la partie antérieure de la tête du spermatozoïde.

Au-delà des réponses apportées sur le mode d'action d'Izumo1 dans l'interaction gamétique, ce travail soulève de nombreuses questions ouvrant la voie à des recherches qui se poursuivront bien au-delà de cette thèse.

Annexes

1. La Séquence Izumo1 Murin

Q9D9J7 (IZUM1_MOUSE)

Length : 397 Mass (Da) 44,885

D'après : <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9D9J7>

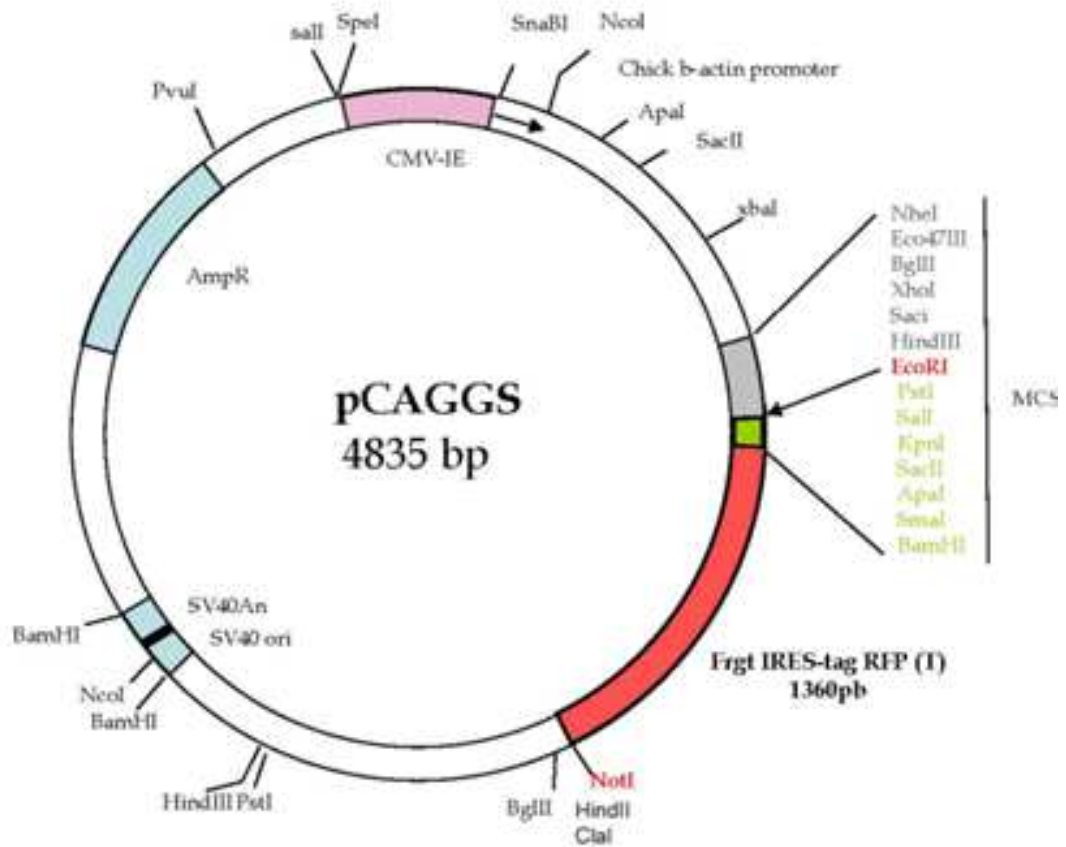
Séquence protéique

10	20	30	40	50	60
MGPHTLLLA	ALANCLCPGR	PCIKCDQFVT	DALKTFENTY	LNDHLPHDIH	KNVMRMVNHE
70	80	90	100	110	120
VSSFQGVVTS	EDSYLGAVDE	NTLEQATWSF	LKDLKRITDS	DLKGELFIKE	LLWMLRHQKD
130	140	150	160	170	180
IFNNLARQFQ	KEVLCPNKG	VMSQTLIWCL	KCEKQLHICR	KSLDCGERHI	EVHRSEDLVL
190	200	210	220	230	240
DCLLSWHRAS	KGLTDYSFYR	VWENSSETLI	AKGKEPYLTK	SMVGPEDAGN	YRCVLDITNQ
250	260	270	280	290	300
GHATVIRYDV	TVLPKHSEE	NQPPNIITQE	EHETPVHVTP	QTPPGQEPES	ELYPELHPEL
310	320	330	340	350	360
YPELIPTVAQ	NPEKKMKTRL	LILLTLGFVV	LVASIIISVL	HFRKVSARKL	NASDEVKPTA
370	380	390			
SGSKSDQSLS	QQMGLKKASQ	ADFNDSYSGD	KSEATEN		

Séquence ADN

atggggccgcattttacactcttgctggcagctcttgccaactgcctgtgtccagggaggccctgcatcaaatgtgaccagtttgtgacagatgcgc
taaagactttcgaaaacacttacctgaatgaccacctgccacacgacattcacaataatgtaatgaggatggtaaccatgaagtatcgagcttc
ggcgtagtcacttcggctgaggattcctatttggggccgtggacgagaacacactggaacaagcaacctggagttttctgaaggatctgaagcg
tattacagacagtgtacttaaaaggagagctcttataaaggaactattgtggatgcttcgtcatcaaaaggacatcttaacaatcttgtagaca
gttccaaaaggaagttctttgtccaacaaatgcggagtgatgtcgcagactttgatctggtgtcttaagtgcgaaaagcagttgcacattgtcgg
aaatccctagattgtggagagcgccacatagaggtacatcgctcggaagacctggctgactgtctgctcagttggcatcgcttctaaggga
cttacagattacagttttacagggtttgggagaacagttctgagaccttgattgccaaggggaaagaaccatatctgaccaagtcgatgggtgggt
ccagaggatgtggaactaccgctgtgtgtagataccatcaaccaaggtcatgccaccgtcatcgctacgatgtcacagtattgccccaaa
gcattcagaggaaaaccaaccacgaacatcataaccaagaggagcagagactcctgtccacgtgactccacagacaccacggggcagg
agccagagtcggagctgtacccggagctgcaccagagttgtaccggagctcatacctacagtcgctcaaaatccagagaaaaaatgaaaa
ctgcctcttaatactgttgaccttggctttgtggtcttggccagcatcattatctcggtacttcactttaggaaagtcagcgctaaattgaaga
atgcaagtgcgaagtcaaacccaccgctcaggatccaagtcagatcagagtttgtccaacagatgggattgaagaaggcctctcaggcaga
tttaactctgactactctggagataagagcgaggcaacagaaaactaa

2. Les vecteurs



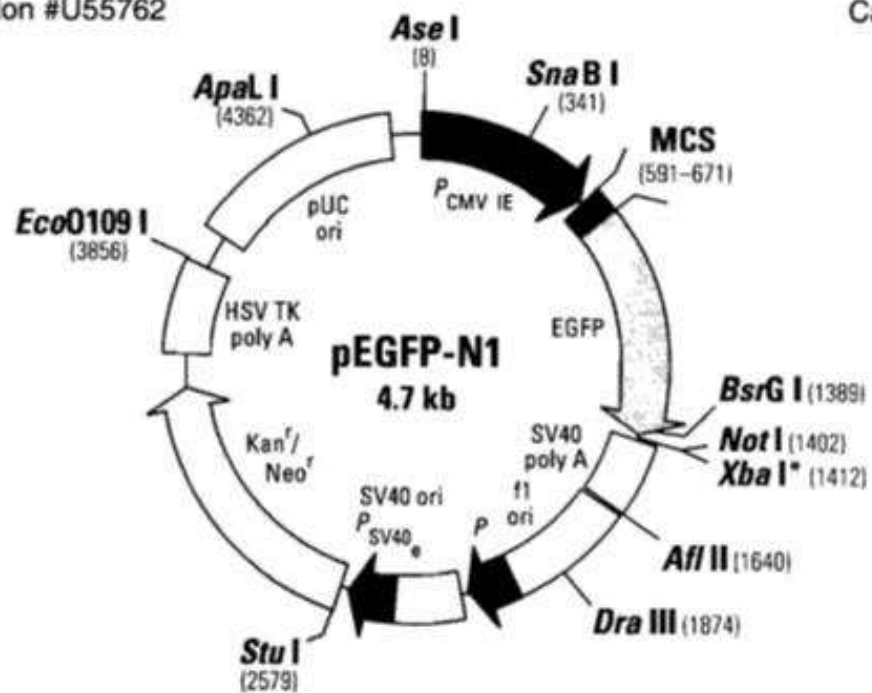
Le plasmide pCAGGS-RFP (X-301 /pCAGGS-IRES2-tagRFP) : vecteur d'expression

pEGFP-N1 Vector Information

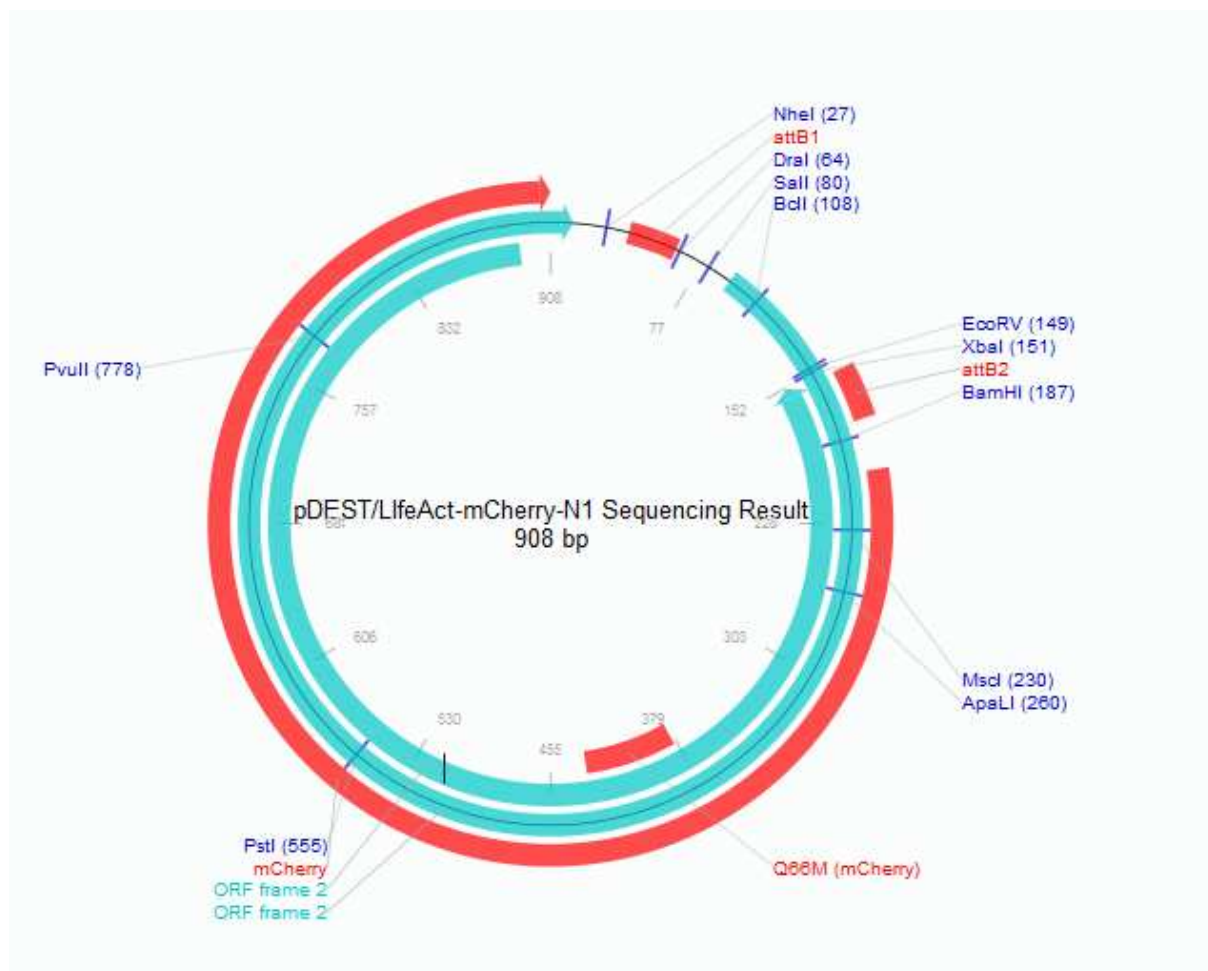
GenBank Accession #U55762

PT3027-5

Catalog #6085-1



Le plasmide pEGFP-N1 : vecteur d'expression



Le plasmide : pDEST/LifeAct-mCherry-N1

3. Protocole de transfection transitoire

Préparation des plasmides :

Dans une hotte stérile à flux laminaire, préparer une 1ère solution de 100µl de NaCl + 8µl de jetPEI®, dans un second eppendorf préparer une solution de 100µl de NaCl + 4µl de solution de plasmide à 1µg/µl.

Ajouter la solution de de jetPEI® à la solution de plasmide. Centrifuger 15 secondes et laisser à température ambiante pendant 20 à 30 minutes pour que les micelles se forment.

La transfection transitoire:

Les cellules sont déposées dans une boîte de culture à 6 puits, dans chaque puits déposer 2ml de cellules à la concentration de $2 \cdot 10^5$ cellules/ml dans leur milieu habituel. Ajouter la solution de jetPEI®+plasmide.

Les cellules sont placées en culture à l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂ dans une hotte humide. Elles expriment la protéine 24 heures plus tard.

4. Protocoles de génotypage pour les différentes lignées de souris

Le génotypage s'effectue par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou polymérisation en chaîne, qui permet d'amplifier un fragment d'ADN extrait de chaque souris. La PCR permet une amplification spécifique de chaque fragment à l'aide d'amorces (oligonucléotides simple brin spécifiques de la séquence à reconnaître) et de détecter ainsi le gène sauvage et/ou le transgène.

Les ADN proviennent de lysats de queues de souriceaux d'une semaine environ. Les bouts de queues de 3 à 5mm sont prélevés à l'animalerie centrale au moment du sexage et du baguage, à chaque échantillon est attribué le numéro de bague de la souris associée afin de ne pas faire d'erreur de génotypage.

La queue est traitée par une solution de lyse comprenant une Solution de tampon (Direct PCR Lysis reagent, Euromedex) à laquelle nous ajoutons de la Protéinase K à 1µg/100µL (il faut compter environ 1µg par mm de queue ; Proteinase K (PK) Promega). Les échantillons sont placés sous agitation à 55°C 12 heures. La protéinase K est désactivée à 95°C pendant dix minutes.

Pour les trois séries de génotypages que nous avons mis au point, les réactions de polymérisation ont été effectuées dans un volume final de 50µL comprenant 4µL d'ADN-cible non quantifié. Les réactifs ont été utilisés aux concentrations suivantes : les quatre nucléotides (dNTP, 10mM de chaque), les amorces spécifiques (20 pM chacune), MgCl₂ (25mM). Plusieurs enzymes ont été testées, nous avons finalement réussi à obtenir une bonne sensibilité avec la polymérase (HotStarTaq PCR Quiagen).

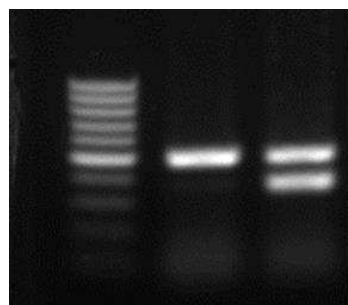
Les lysats sont ajoutés à la solution de réactifs préparés selon les protocoles représentés sur les tableaux 1, 2 et 3 correspondants aux protocoles pour chaque lignée de souris. Les aliquotes sont placés dans le thermocycleur. Les cycles commencent d'abord par un chauffage à 95°C pendant 15 minutes pour dénaturer l'ADN, plusieurs cycles sont ensuite nécessaires à la réaction : dénaturation à 94°C pendant 1 minute, hybridation 64°C pendant 1 minute (la température d'hybridation dépend de l'amorce utilisée, pour ces séries de génotypage j'ai vérifié les températures d'hybridation en faisant des gradients de température), élongation à 72°C pendant 2 minutes.

Les analyses se font par révélation sur gel d'agarose à 1% en présence de bromure d'éthidium sous éclairage ultraviolet.

1. Protocole de génotypage des souris CD9 KO

Pour cette lignée de souris nous avons accouplé les souris femelles CD9 +/- avec des mâles -/- car les souris d'intérêt sont les souris CD9 -/- infertiles (les détails des lignées et des accouplements sont expliqués au chapitre 1 de la 2^{ème} partie). Nous avons donc amplifié les allèles sauvage et recombinant.

La température d'hybridation est de 70°C, pour ce génotypage nous avons amplifié à 42 cycles.



L'allèle recombinant (354 bp) est amplifié par les amorces suivantes :

- 5' TGC AGG CAT GGA GGC GCA GC 3' UP1
- 5' GTG CCG GCC TCG CCT TTC CC 3' LO1

L'allèle sauvage (550 bp) est amplifié par les amorces suivantes :

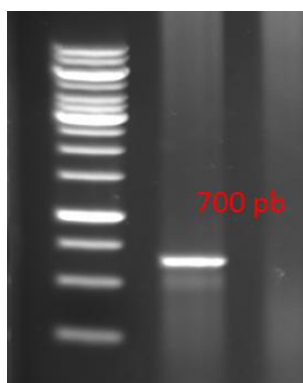
- 5' CTG GTC ACA CCC CCT AAC GGA GC 3' MCD91739
- 5' AGA GCT TGG CGG CGA ATG GGC TGA 3' S2Neo

	Pour un échantillon/μl
Tampon 10X	5
5X Q-Solution	10
MgCl ² 25mM	2
Dntp 10mM	1
Amorce 1 20pM	2,5
Amorce 2 20pM	2,5
Amorce 3 20pM	2,5
Amorce 4 20pM	2,5
H2O	17,5
+ 4 μL ADN	4
Hot Strat Taq	0,5
Volume total	50

Tableau 1 : Protocole de génotypage de des souris CD9 KO

2. Protocole de géotypage des souris CD9-EGFP

Ces souris sont normalement homozygotes pour le transgène, mais nous avons été amenés à les géotyper par PCR lors de la décontamination de la lignée (les détails de la décontamination de cette lignée sont décrits au chapitre 1 de la 2^{ème} partie). La température d'hybridation est de 60°C, pour ce géotypage nous avons amplifié à 30 cycles. L'allèle recombinant (700 bp) est amplifié par les amorces suivantes :



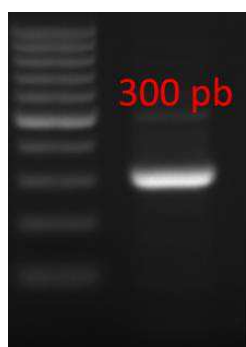
- 5' TGAACCGCATCGAGCTGAAGGG3' EGFP-CD9S
- 5' GAATATCACCAAGAGGAACC3' EGFP-CD9A

	Pour un échantillon/μl
Tampon 10X	5
5X Q-Solution	10
MgCl ² 25mM	2
Dntp 10mM	1
Amorce 1 20pM	2,5
Amorce 2 20pM	2,5
H2O	22,5
+ 4 μL ADN	4
Hot Strat Taq	0,5
Volume total	50

Tableau 2 : Protocole de géotypage des souris CD9-EGFP

3. Protocole de génotypage des souris Acr-EGFP

Ces souris sont normalement également homozygotes pour le transgène, les génotypages ont été nécessaires lors de la décontamination de la lignée mais également car les femelles avaient une malformation de la cloison utérine nous obligeant à avoir recours aux accouplements avec des femelles sauvages (les détails relatifs à la gestion de cette lignée sont décrits au chapitre 1 de la 2^{ème} partie). La température d'hybridation est de 65°C, pour ce génotypage nous avons amplifié à 32 cycles. L'allèle recombinant (300 bp) est amplifié par les amorces suivantes :



- 5' GTGGAGCTTTGTGAGGTCACAG 3' Acro
- 5' CAGCTTGCCGGTGGTGCAGATG 3' Acro-EGFP

	Pour un échantillon/μl
Tampon 10X	5
5X Q-Solution	10
MgCl ² 25mM	2
Dntp 10mM	1
Amorce 1 20pM	2,5
Amorce 2 20pM	2,5
H2O	22,5
+ 4 μL ADN	4

Tableau 3: Protocole de génotypage des souris Acro-EGFP

5. Protocole de mutagénèse et clonage

La séquence d'ADN d'intérêt (Izumo1 murin) sans le codon stop a été fournie par Eurogentec dans un plasmide vecteur pUC57- IZUM1_MOUSE. La séquence d'Izumo1 a été isolée après digestion du plasmide pUC57-IZUM1_MOUSE par les enzymes de restrictions Nhe1 et Xho1 et insérée dans le plasmide pEGFP-N1.

Pour obtenir le vecteur plzumo1-RFP, nous avons amplifié la séquence d'Izumo1 par réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR) en utilisant les amorces afin de rajouter le codon stop par mutagénèse dirigée et l'avons sous-clonée dans le vecteur pCAGGS-RFP entre les sites Nhe1 et Xho1. Ce plasmide nous a été généreusement donné par le Dr. Xavier Morin (IBENS, Paris).

a. La transformation bactérienne par choc thermique

Les plasmides sont amplifiés (multipliés en plusieurs exemplaires identiques) grâce à des bactéries compétentes. Celles-ci sont des bactéries dépourvues de plasmide propre et sont traitées de manière à intégrer le plasmide cible.

Nous avons ajouté 0,5µg de chacun des trois plasmides (pUC57- IZUM1_MOUSE sans le codon stop, pCAGGS-RFP et pEGFP-N1) à 100µL de bactéries compétentes de la souche Escherichia coli Top10 F' (Life Technologies). Les bactéries sont incubées 10 minutes dans la glace afin de stabiliser les membranes. Le plasmide est ensuite ajouté. La perméabilité de la membrane est augmentée par choc thermique (passage de 0 à 42°C pendant 10 secondes). Le plasmide est laissé ensuite dix minutes en contact avec les bactéries à 4°C dans la glace afin de s'y incorporer. Une première culture est obtenue par ajout de 300µL de milieu liquide Luria Broth (LB) sans antibiotiques. Cette culture est transférée à 37°C durant une heure. Le tout estensemencé sur milieu gélosé (LB Agar) auquel est ajouté l'antibiotique approprié approprié (l'antibiotique correspondant à chacun des deux plasmide est indiqué en annexe 2 pendant une nuit à 37°C. La sélection des bactéries ayant intégré le plasmide se fait par l'antibiotique.

Le lendemain, les cultures ayant poussé la veille sont réensemencées en milieu liquide additionné de l'antibiotique de sélection, celui-ci est remis en incubateur une nuit. L'extraction du plasmide se fait le lendemain. Nous avons utilisé les systèmes d'extraction de plasmides NucleoBond Xtra Midi / Midi Plus de (MACHEREY-NAGEL) selon les indications du fabricant.

b. Le sous clonage du plasmide plzumo1-EGFP

Les solutions de plasmides obtenues avaient les concentrations suivantes :

- pUC-IZUMO1 : 1169,6 ng/µ L
- pEGFP-N1 : 4400 ng/µL

La séquence Izumo1 sans le codon stop (1-396) a été obtenue par digestion enzymatique entre les sites Nhe1 et Xho1 par les enzymes de restriction Nhe1 et Xho1. La séquence à insérer a été obtenue par digestion de 30 µg de pUC57- IZUM1_MOUSE par 30U de Nhe1 et 30U de Xho1 dans 50µL de tampon final (New England Biolabs). La digestion a été faite 2h à 37°C. Les enzymes de restriction ont été inactivés thermiquement à 65°C pendant 20 min.

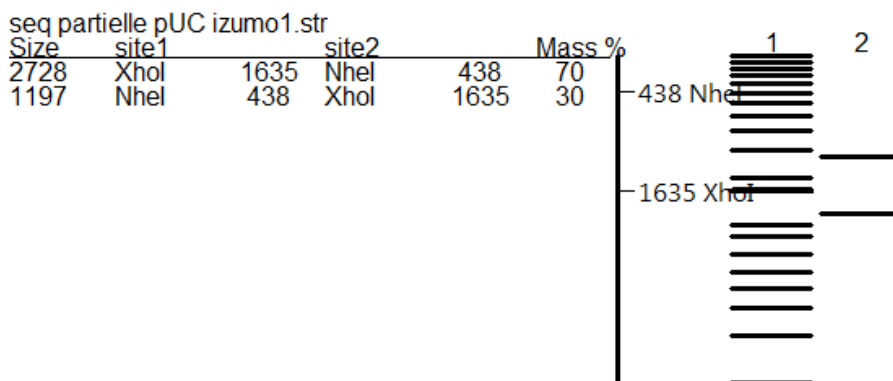
Afin d'obtenir le vecteur ; 10 µg de plasmide pEGFP-N1 ont été digérés par 10U de Nhe1 et 10U de Xho1 (New England Biolabs) dans 50µL de volume final (tampon fourni par le New England Biolabs). La digestion a été faite pendant 2h à 37°C. Les enzymes de restriction ont été inactivés thermiquement à 65°C pendant 20 min.

L'ADN vecteur a été déphosphorylé à l'aide d'une enzyme phosphatase (Fast AP Fermentas) à 10U pendant 15 min à 37°C puis 15 min à 75°C. Afin d'enlever l'enzyme alcaline phosphatase, le fragment d'ADN déphosphorylé a été purifié par le système de purification "PCR Clean Up" (MACHEREY-NAGEL). L'ADN extrait est élué dans 30µL d'eau DNA.

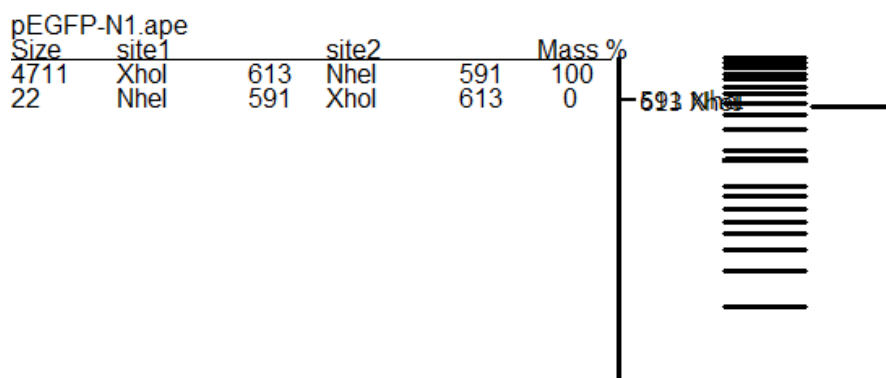
Les ADN linéarisés (vecteur et insert) ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose 0,7 % (protocole standard du système Macherey-Nagel).

Les bandes attendues sont :

- Izumo1 sans la séquence stop : 1197pb



- pEGFP-N1



Les quantifications par gel d'agarose confirment la présence des bandes attendues.

Les fragments d'ADN ont ensuite été extraits par le système d'extraction NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) selon les indications du fabricant et dosés au spectrophotomètre :

Izumo1 : 327 ng/ μ L

vecteur pEGFP-N1 : 155 ng/ μ L

L'insert et le vecteur sont ensuite mis dans une proportion de 3 pour 1 en présence de 1 μ L d'enzyme ligase et de tampon de ligation (New England Biolabs) pour un volume final de 10 μ L. La réaction a été effectuée durant 4 heures à température ambiante.

Le produit de ligature a ensuite été utilisé pour transformer des bactéries compétentes Top 10 F' et ensemencé sur gélose avec antibiotique de sélection et mis en culture une nuit à 37°C. Le lendemain 10 colonies ont été prélevées et ensemencées dans 3mL de milieu liquide LB avec antibiotique. Les plasmides recombinants ont été obtenus par purification à l'aide des systèmes de purification NucleoSpin Plasmid (de Macherey Nagel).

Pour faire le criblage des clones nous avons opté pour la méthode de digestion enzymatique. Les plasmides purifiés ont été digérés par NheI et XhoI et séparés par électrophorèse. On retrouve les bandes aux poids attendus soit 4700 pb pour le pEGFP-N1 et 1197pb pour Izumo1 sans la séquence stop. Les plasmides recombinants ont été séquencés par la société GATC à l'aide des amorces pEGFP_N1 5'CCGTCCAGCTCGACCAG3' universelle et Izumo1_Stop 5'GCTCGAGttaGTTTTCTGTTGCCTCGCTC3'. Le séquençage était correct.

c. Le sous clonage du plasmide plzumo1-RFP

Les solutions de plasmides de départ avaient les concentrations suivantes :

- pUC-IZUMO1 : 1169,6 ng/ μ L
- pCAGGS-RFP : 2147,8ng/ μ L
- Obtention de la séquence Izumo1 complète par mutagénèse dirigée

La séquence complète d'Izumo1 a été obtenue par mutagénèse dirigée. La technique consiste en l'amplification de l'ADN d'intérêt à l'aide d'amorces simple brin qui ont la mutation désirée. La séquence est amplifiée par PCR (le principe de la PCR est expliqué en annexe 4). Les amorces que nous avons utilisées sont les suivantes : 5' TTGCTAGCATGGGGCCGCATTTTAC 3' et pour l'amorce introduisant le codon « stop » 5' GGCTCGAGttaGTTTTCTGTTGCCTCGCTC 3'. Le produit PCR est ensuite migré sur gel d'électrophorèse afin d'en vérifier le poids et purifié comme décrit précédemment.

- Le sous clonage dans pCAGGS-RFP

Le vecteur a été digéré comme décrit précédemment. La ligation a été faite dans les proportions de 1 pour 3 (vecteur/ insert). La suite du sous clonage a été faite selon le même protocole que pour le plzumo1-EGFP. Les plasmides recombinants ont été séquencés par la société GATC à l'aide des séquences pIRES-RP 5' TATAGACAAACGCACACCG 3' universelle et Izumo1_Stop 5' GGCTCGAGttaGTTTTCTGTTGCCTCGCTC 3'. Le séquençage était correct.

6. Fonctionnalisation de la surface des billes de verre et des globules rouges pour le Biomembrane Force Probe

Les protocoles décrits ci-dessous nous ont été aimablement fournis par Evan Evans qui les a mis au point.

Dans les protocoles reviennent à plusieurs reprises les solutions tampons suivantes :

- CB-180 : carbonate-bicarbonate 0,1 M, pH 8,5, 180 mOsm.
- TBS-216 : Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, 316 mOsm.
- PBS-290: PBS 0,1 M, NaCl 150 mM, pH 7,4, 290 mOsm.

a. Préparation des billes de verre streptavidinylées

Les billes utilisées sont d'un diamètre de 3µm (à 2% près selon les informations fournies par le fabricant Bang Labs, USA). Pour les recouvrir de streptavidine, on utilise un protocole comprenant 4 étapes :

- lavage des billes
- leur silanisation
- une première fonctionnalisation avec de la biotine
- la streptavidination

i. Lavage des billes

Cette étape a pour fonction d'augmenter le nombre de groupements OH à la surface des billes.

1. On fait bouillir la solution composée de 5% d'eau oxygénée (30%) et 95% d'eau, contenant les billes suspendues, et dont le pH a été amené à 10,9 par ajout d'ammoniaque.
2. On centrifuge et on retire le surnageant.
3. On rince plusieurs fois à l'eau par une succession de centrifugation et resuspension.
4. On resuspend dans du méthanol.

ii. Silanisation des billes

Cette étape consiste à lier de manière covalente des groupements amino-silanes à la surface du verre par l'intermédiaire des groupements -OH du verre.

5. On fait incuber, pendant 1 heure, 1 ml de bille à température ambiante dans un mélange contenant 45,6 ml méthanol, 0,4 ml d'acide acétique, 1,85 ml H₂O et 1,15 ml AEAPTMS (N-2-aminoéthyl-3-aminopropyltriméthoxysilane).
6. On centrifuge et on rince dans le méthanol.
7. On suspend les billes dans 2 gouttes de méthanol, puis on fait sécher sous flux d'argon, puis 10 minutes dans une étuve à 80°C. On place les billes dans un dessiccateur pour la nuit.

8. Le lendemain, on resuspend dans du méthanol puis on change progressivement l'environnement de la bille du méthanol vers le PBS-290.

Les billes, recouvertes de groupements NH₂ sont désormais prêtes pour la biotinylation par réaction avec les groupements NHS.

iii. Biotinylation des billes

Cette étape permet de recouvrir les billes de biotine avec une densité surfacique d'environ 10%.

9. On lave et on resuspend 100 µl de billes dans la solution tampon CB-180.

10. On mélange deux solutions de 0,5 mM de NHS-(CH₂)₁₀-biotine (Interchim, France) et 4,5 mM Sulfo-MBS (m-Maleimidoenzoyl-N-hydroxysuccimide ester, Pierce, c/o Touzart et Matignon, France) dans le CB-180. On y fait incuber les billes pendant 1 heure à température ambiante sous légère agitation.

11. On rince et on resuspend dans la solution tampon TBS-316. On laisse incubé pendant 30 minutes sous légère agitation.

12. On centrifuge et on resuspend dans du PBS-290.

iv. Streptavidination des billes

La streptavidination se fait par simple incubation des billes dans une solution en excès par rapport aux biotines portées par les billes.

b. Préparation de globules rouges biotinylés

Les globules rouges sont biotinylés par incubation en présence d'une solution de polyéthylène glycol avec biotine (NHS-PEG3400-biotine, Interchim, Montluçon, France) qui réagit avec les groupements amines. Conservés à 4°C, les globules rouges sont utilisables pendant 2 à 3 semaines.

Le protocole est identique à celui de biotinylation des billes pour les étapes 9 à 12, en remplaçant l'étape 10 par une incubation des billes dans une solution de contenant 0,4 mg/ml de NHS-PEG3400-biotine dans du CB-180.

Bibliographie

- Abdallah, B. et al., 1996. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Human Gene Therapy*, 1954(Vol. 7), pp.1947–1954.
- Alfandari, D. et al., 1999. les protéines de la famille ADAM : protéolyse, adhérence et signalisation. *Médecine/Sciences*, 15(1), pp.1148–1152.
- Alfieri, J. a et al., 2003. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *Journal of cell science*, 116(Pt 11), pp.2149–55.
- Almeida, E. a et al., 1995. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*, 81(7), pp.1095–104.
- Aricescu, a R. & Jones, E.Y., 2007. Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Current opinion in cell biology*, 19(5), pp.543–50.
- Baba, D. et al., 2002. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *The Journal of biological chemistry*, 277(33), pp.30310–4.
- Baker, M. a et al., 2012. Analysis of phosphopeptide changes as spermatozoa acquire functional competence in the epididymis demonstrates changes in the post-translational modification of Izumo1. *Journal of proteome research*, 11(11), pp.5252–64.
- Balakier, H. et al., 2002. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(11), pp.2938–47.
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Saffar, L., et al., 2007. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC developmental biology*, 7, p.102.
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Bomsel, M., et al., 2007. Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(13), pp.3446–9.
- Bayas, M. V et al., 2006. Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. *Biophysical journal*, 90(4), pp.1385–95.
- Berditchevski, F., 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *Journal of cell science*, 114(Pt 23), pp.4143–51.
- Berditchevski, F. & Odintsova, E., 1999. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *The Journal of cell biology*, 146(2), pp.477–92.
- De Blas, G. a et al., 2005. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS biology*, 3(10), p.e323.

- Borg, C.L. et al., 2010. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a “non-performer”. *Human reproduction update*, 16(2), pp.205–24.
- Boucheix, C. et al., 1991. Molecular Cloning of the CD9 Antigen. *The Journal of biological chemistry*, 266(5), pp.117–122.
- Boucheix, C. & Rubinstein, E., 2001. Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, pp.1189–1205.
- Bowen, J. a & Hunt, J.S., 2000. The role of integrins in reproduction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 223(4), pp.331–43.
- Brakebusch, C. & Fassler, R., 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO Journal*, 22(10), pp.2324–2333.
- Brewis, I. a & Gadella, B.M., 2010. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Molecular human reproduction*, 16(2), pp.68–79.
- Bronson, R., 1998. Is the oocyte a non-professional phagocyte? *Human reproduction update*, 4(6), pp.763–75.
- Bronson, R. a & Fusi, F., 1990. Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. *Biology of reproduction*, 43(6), pp.1019–25.
- Brümmendorf, T. & Lemmon, V., 2001. Immunoglobulin superfamily receptors : cis-interactions , intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Current Opinion in Cell Biology* (13), pp.611–618.
- Burkart, A.D. et al., 2012. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *The Journal of cell biology*, 197(1), pp.37–44.
- Burns, K.H., 2002. Characterization of Integrin Expression in the Mouse Ovary. *Biology of Reproduction*, 67(3), pp.743–751.
- Byskov, A.G. et al., 2005. Eggs forever? *Differentiation; research in biological diversity*, 73(9-10), pp.438–46.
- Carrell, D.T. et al., 1999. CLINICAL ASSISTED REPRODUCTION A Simplified Coculture System Using Homologous , Attached Cumulus Tissue Results in Improved Human Embryo Morphology and Pregnancy Rates During In Vitro Fertilization, 16(7), pp.344–349.
- Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. 1974 ; Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst. Sep*;53(3):661-74.
- Charrin, S. et al., 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS letters*, 516(1-3), pp.139–44.
- Charrin, S. et al., 2003. EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *The Biochemical journal*, 373(Pt 2), pp.409–21.

- Charrin, S. et al., 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical journal*, 420(2), pp.133–54.
- Chen, E.H. et al., 2007. Cell-cell fusion. *FEBS letters*, 581(11), pp.2181–93.
- Chen, M.S. et al., 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6\beta 1$: implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), pp.11830–5.
- Chu, Y.-S. et al., 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *The Journal of cell biology*, 167(6), pp.1183–94.
- Clark, S. & Naz, R.K., 2013. Presence and incidence of izumo antibodies in sera of immunoinfertile women and men. *American journal of reproductive immunology* (New York, N.Y. : 1989), 69(3), pp.256–63.
- Classon, B.J. et al., 1989. The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen. *The Journal of experimental medicine*, 169(April), pp.1497–502.
- Classon BJ et al., 1990. The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen. *J Exp Med.*, 172(September), p.1007.
- Coonrod, S. a et al., 1999. Treatment of mouse oocytes with PI-PLC releases 70-kDa (pI 5) and 35- to 45-kDa (pI 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. *Developmental biology*, 207(2), pp.334–49.
- Costa, P. & Parsons, M., 2010. *New insights into the dynamics of cell adhesions*. 1st ed., Elsevier Inc.
- Dean, J., 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 26(1), pp.29–38.
- Ellerman, D. a et al., 2003. Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Molecular biology of the cell*, 14(12), pp.5098–103.
- Ellerman, D. a et al., 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular reproduction and development*, 76(12), pp.1188–99.
- Eto, K. et al., 2002. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin $\alpha 9\beta 1$: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *The Journal of biological chemistry*, 277(20), pp.17804–10.
- Evans, E. & Ritchie, K., 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical journal*, 72(4), pp.1541–55.
- Evans E, 1998. Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy. *Faraday Discuss.*; (111):1-16.

- Evans, J.P., 2001. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23(7), pp.628–39.
- Evans, J.P., 1999. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci*, 4(1), pp.114–131.
- Evans, J.P., 2012. Sperm-egg interaction. *Annual review of physiology*, 74, pp.477–502.
- Evans, J.P., Schultz, R.M. & Kopf, G.S., 1995. Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta. *Journal of cell science*, 108 (Pt 1, pp.3267–78.
- Familiari, G. et al., 2006. Ultrastructural dynamics of human reproduction, from ovulation to fertilization and early embryo development. *International review of cytology*, 249(06), pp.53–141.
- Finaz, C. & Hammami-Hamza, S., 2000. Adhesion proteins expressed on human gamete surfaces and egg activation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 92(3-4), pp.235–44.
- Fujiyama, Y. et al., 2010. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *Journal of cell science*, 123(Pt 9), pp.1531–6.
- Gadella, B.M., 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal reproduction science*, 107(3-4), pp.229–36.
- Gadella, B.M. & Evans, J.P., 2011. *Cell Fusion in Health and Disease* T. Dittmar & K. S. Zänker, eds., Dordrecht: Springer New York.
- Geiger, B. & Bershadsky, A., 2002. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*, 110(2), pp.139–42.
- Van Gestel, R. a et al., 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Molecular human reproduction*, 13(7), pp.445–54.
- Granados-Gonzalez, V. et al., 2008. Preliminary study on the role of the human IZUMO gene in oocyte-spermatozoa fusion failure. *Fertility and sterility*, 90(4), pp.1246–8.
- Grayson, P. & Civetta, A., 2012. Positive Selection and the Evolution of izumo Genes in Mammals. *International journal of evolutionary biology*, 2012, p.958164.
- Gupta, G.S., 2005. *Proteomics of Spermatogenesis*, Springer New York.
- Gupta, S.K. & Bhandari, B., 2011. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian journal of andrology*, 13(1), pp.97–105.
- Gutierrez-Lopez, M.D. et al., 2003. A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *The Journal of biological chemistry*, 278(1), pp.208–18.

- Harper, C. V et al., 2008. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *Journal of cell science*, 121(Pt 13), pp.2130–5.
- Hayasaka, S. et al., 2007. Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertility and sterility*, 88(1), pp.214–6.
- He, Z.-Y. et al., 2009. Loss of surface EWI-2 on CD9 null oocytes. *Molecular reproduction and development*, 76(7), pp.629–36.
- He, Z.-Y. et al., 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm–egg binding and fusion. *Developmental Biology*, 254(2), pp.226–237.
- Helenius, a., 2001. Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science*, 291(5512), pp.2364–2369.
- Hemler, M.E., 2001. Specific tetraspanin functions. *The Journal of cell biology*, 155(7), pp.1103–7.
- Hotta, H. et al., 1988. Molecular Cloning and Characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression Molecular Cloning and Characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression1. *Cancer research*, pp.2955–2962.
- Huang, J., 1999. TCR-Mediated Internalization of Peptide-MHC Complexes Acquired by T Cells. *Science*, 286(5441), pp.952–954.
- Hudrisier, D. et al., 2001. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *The journal of immunology*, Mar(166), pp.3645–9.
- Inoue, N. et al., 2010. Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. *PloS one*, 5(4), p.e10301.
- Inoue, N. et al., 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 434(7030), pp.234–238.
- Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M., 2008. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(3), pp.910–4.
- Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M., 2011. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian journal of andrology*, 13(1), pp.81–7.
- Inoue, N. & Okabe, M., 2008. Sperm-egg fusion assay in mammals. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 475, pp.335–45.
- Jégou, A. et al., 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *PNAS*, July 5(108), pp.10946–10951.
- Jégou, A., 2008. Etude de l' Adhésion Gamétique par Mesure de Force. Thèse de doctorat de l'Université Paris VII.

- Jégou, A. et al., 2008. Mapping mouse gamete interaction forces reveal several oocyte membrane regions with different mechanical and adhesive properties. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(4), pp.1451–8.
- Jin, M. et al., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), pp.4892–6.
- Johnson, J. et al., 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428(6979), pp.145–50.
- Kaji, K. et al., 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature genetics*, 24(3), pp.279–82.
- Kim, E. et al., 2013. Molecular cloning, characterization of porcine IZUMO1, an IgSF family member. *Reproduction in domestic animals*, 48(1), pp.90–7.
- Krementsov, D.N. et al., 2009. Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology*, 6, p.64.
- Kulin, S. et al., 2002. Real-time measurement of spontaneous antigen-antibody dissociation. *Biophysical journal*, 83(4), pp.1965–73.
- Lee, D.R. et al., 1997. Induction of acrosome reaction in human spermatozoa accelerates the time of pronucleus formation of hamster oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 67(2), pp.315–20.
- Levy, S. & Shoham, T., 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature reviews. Immunology*, 5(2), pp.136–48.
- Lishko, P. V, Botchkina, I.L. & Kirichok, Y., 2011. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), pp.387–91.
- Liu, D.Y., 2003. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction*, 18(11), pp.2382–2389.
- Löffler, S. et al., 1997. CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol.* 1997 January; 71(1): 42–49., 71(1), pp.42–9.
- Lozzio, C.B. & Lozzio, B.B., 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 45(3), pp.321–34.
- M. J. Wolkowicz et al., 2008. Equatorial Segment Protein (ESP) Is a Human Alloantigen Involved in Sperm-Egg Binding and Fusion. *J Androl.*, 29(3), pp.272–282.
- Maecker HT, SC, T. & Levy S., 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal*, vol. 11(May), pp.428–442.

- Martens, S. & McMahon, H.T., 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(7), pp.543–56.
- Martinez-Rico, C. et al., 2005. Separation force measurements reveal different types of modulation of E-cadherin-based adhesion by nectin-1 and -3. *The Journal of biological chemistry*, 280(6), pp.4753–60.
- McGahan, B.A. et al., 1994. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, 83(5), pp.1179–1187.
- Miller, B.J. et al., 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6\beta 1$ and is CD9-dependent. *The Journal of cell biology*, 149(6), pp.1289–96.
- Miranda, P. V et al., 2009. Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biology of reproduction*, 80(5), pp.897–904.
- Miyado, K., 2000. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization. *Science*, 287(5451), pp.321–324.
- Miyado, K. et al., 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5451), pp.321–4.
- Miyado, K. et al., 2008. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), pp.12921–6.
- Mohandas, N. & Evans, E., 1984. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors. *Blood*, 84, pp.282–287.
- Murphy, G., 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer*, 8(12), pp.929–41.
- Myles, D.G. et al., 1987. Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 513, pp.262–73.
- Nakamura, Y. et al., 2001. Immunohistochemical Distribution of CD9, Heparin Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor, and Integrin $\alpha 3 \beta 1$ in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(4), pp.439–444.
- Nakanishi, T. et al., 2001. Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Developmental biology*, 237(1), pp.222–31.
- Nakanishi, T. et al., 1999. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS letters*, 449(2-3), pp.277–83.
- Le Naour, F. et al., 2000. Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice. *Science*, 287(January), pp.1998–2000.
- Le Naour, F. et al., 2004. Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 53(3), pp.148–52.

- Naz, R.K., 2008. Immunocontraceptive Effect of Izumo and Enhancement by Combination Vaccination. *Molecular reproduction and development*, 344(April 2007), pp.336–344.
- Nishimura, H. et al., 2001. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Developmental biology*, 233(1), pp.204–13.
- Nishimura, H. et al., 2011. Characterization of mouse sperm TMEM190, a small transmembrane protein with the trefoil domain: evidence for co-localization with IZUMO1 and complex formation with other sperm proteins. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(4), pp.437–51.
- Ohnami, N. et al., 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology open*, 1(7), pp.640–7.
- Okabe, M. et al., 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, 407(3), pp.313–319.
- Okabe, M. et al., 1987. Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *Journal of reproductive immunology*, 11(2), pp.91–100.
- Okabe, M. et al., 1988. Effect of a monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. *Journal of reproductive immunology*, 13(3), pp.211–9.
- Pacchiarotti, J. et al., 2010. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation; research in biological diversity*, 79(3), pp.159–70.
- Patrat, C., Serres, C. & Jouannet, P., 2000. Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 62(5), pp.1380–6.
- Patrat, C., Serres, C. & Jouannet, P., 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92, pp.1–12.
- Pontén J, Saksela E. 1967. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer*. Sep 15;2(5):434-47.
- Primakoff, P., Hyatt, H. & Tredick-Kline, J., 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology*, 104(1), pp.141–9.
- Primakoff, P. & Myles, D.G., 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5576), pp.2183–5.
- Ray, A. & Treloar, H.B., 2012. Molecular and Cellular Neuroscience IgSF8 : A developmentally and functionally regulated cell adhesion molecule in olfactory sensory neuron axons and synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50(3-4), pp.238–249.
- Rosales, C. & Brien, V.O., 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochimica et biophysica acta*. 1242 (1995) 77-98.

- Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., et al., 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental biology*, 290(2), pp.351–8.
- Rubinstein, E., Ziyat, A., Wolf, J.-P., et al., 2006. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Seminars in cell & developmental biology*, 17(2), pp.254–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574441> [Accessed February 27, 2013].
- Runge, K.E. et al., 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental biology*, 304(1), pp.317–25.
- Ruoslahti, E. & Obrink, B., 1996. Common principles in cell adhesion. *Experimental cell research*, 227(1), pp.1–11.
- Satouh, Y. et al., 2012. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of cell science*, 125(Pt 21), pp.4985–90.
- Schwartz, M. a, 2001. Integrin signaling revisited. *Trends in cell biology*, 11(12), pp.466–70.
- Sengoku, K. et al., 2004. Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion. *Human reproduction (Oxford, England)*, 19(3), pp.639–44.
- Shur, B.D., Rodeheffer, C. & Ensslin, M.A., 2004. Quick guide Mammalian fertilization. *Current biology*, Volume 14(Issue 17), pp.691–692.
- Skaznik-Wikiel, M. et al., 2007. Serious doubts over “Eggs forever?”. *Differentiation; research in biological diversity*, 75(2), pp.93–9.
- Sosnik, J. et al., 2009. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *Journal of cell science*, 122(Pt 15), pp.2741–9.
- Springer, T.A. & Wang, J.-H., 2004. The Three-Dimensional Structure of Integrins and their Ligands, and Conformational Regulation of Cell Adhesion. *Advances in Protein Chemistry*, 68, pp.29–63.
- Stein, K.K. et al., 2006. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics*, 6(12), pp.3533–43.
- Stein, K.K., Primakoff, P. & Myles, D., 2004. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *Journal of cell science*, 117(Pt 26), pp.6269–74.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T. V & Hemler, M.E., 2001. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *The Journal of biological chemistry*, 276(44), pp.40545–54.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T. V & Hemler, M.E., 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in biochemical sciences*, 28(2), pp.106–12.
- Sutherland JA, Turner AR, Mannoni P, McGann LE, Turc JM. 1986 ; Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages. *J Biol Response Mod.* Jun;5(3):250-62.

- Takao, Y. et al., 1999. CD9 is expressed on the cell surface of human granulosa cells and associated with integrin $\alpha 6 \beta 1$. *Molecular human reproduction*, 5(4), pp.303–10.
- Takeda, Y. et al., 2003. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *The Journal of cell biology*, 161(5), pp.945–56.
- Talbot, P. & Dandekar, P., 2003. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microscopy research and technique*, 61(4), pp.349–57.
- Tamkun, J.W. et al., 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46(2), pp.271–82.
- Tanghe, S. et al., 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular reproduction and development*, 61(3), pp.414–24.
- Tarone, G. et al., 1993. Expression of beta 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development (Cambridge, England)*, 117(4), pp.1369–75.
- Thiery, J., 2003. Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(4), pp.365–371.
- Tomes, C.N., 2007. *Acrosomal Exocytosis* Landes Bioscience and Springer, ed.,
- Visconti, P.E. & Kopf, G.S., 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of reproduction*, 59(1), pp.1–6.
- Vjugina, U. et al., 2009. Reduction of mouse egg surface integrin $\alpha 9$ subunit (ITGA9) reduces the egg's ability to support sperm-egg binding and fusion. *Biology of reproduction*, 80(4), pp.833–41.
- Van Vliet, C. et al., 2003. Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 83(1), pp.1–45.
- Wang, H.-X. et al., 2011. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *Journal of cell science*, 124(Pt 16), pp.2702–10.
- Wang, M. et al., 2009. Immunocontraceptive potential of the Ig-like domain of Izumo. *Molecular reproduction and development*, 76(8), pp.794–801.
- Wassarman, P.M., 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, 96(2), pp.175–83.
- Wassarman, P.M., 2009. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31(2), pp.153–8.
- Wassarman, P.M., Jovine, L. & Litscher, E.S., 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology*, 3(2), pp.E59–64.
- Waterhouse, R., Ha, C. & Dveksler, G.S., 2002. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *The Journal of experimental medicine*, 195(2), pp.277–82.

- Weinman, S. & Méhul, P., 2004. *Toute la biochimie* Dunod, ed.,
- Weng, J. et al., 2009. Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *Journal of virology*, 83(15), pp.7467–74.
- Wessel, G.M. et al., 2001. The biology of cortical granules. *International review of cytology*, 209, pp.117–206.
- Wolfsberg, T.G. & White, J.M., 1996. ADAMs in fertilization and development. *Developmental biology*, 180(2), pp.389–401.
- Wolkowicz, M.J. et al., 2003. Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal subcompartment persisting throughout acrosomal biogenesis. *Biology of reproduction*, 69(3), pp.735–45.
- Wozniak, M. a et al., 2004. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et biophysica acta*, 1692(2-3), pp.103–19.
- Xing, W.-J. et al., 2011. Molecular cloning and characterization of Izumo1 gene from sheep and cashmere goat reveal alternative splicing. *Molecular biology reports*, 38(3), pp.1995–2006.
- Yanagimachi, R., 2011. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biology of reproduction*, 85(1), pp.4–5.
- Yáñez-Mó, M. et al., 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in cell biology*, 19(9), pp.434–46.
- Yang, X. et al., 2004. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *The Journal of cell biology*, 167(6), pp.1231–40.
- Yang, X.H. et al., 2006. Contrasting effects of EWI proteins, integrins, and protein palmitoylation on cell surface CD9 organization. *The Journal of biological chemistry*, 281(18), pp.12976–85.
- Yokoo, M. & Sato, E., 2004. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *International review of cytology*, 235, pp.251–91.
- Yuan, R., Primakoff, P. & Myles, D.G., 1997. A Role for the Disintegrin Domain of Cyritestin, a Sperm Surface Protein Belonging to the ADAM Family, in Mouse Sperm–Egg Plasma Membrane Adhesion and Fusion. *The Journal of cell biology*, 137(1), pp.105–112.
- Ziyyat, A. et al., 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of cell science*, 119(Pt 3), pp.416–24.

Rôle de la protéine spermatique Izumo1 dans l'interaction gamétique chez le murin

Abstract

Adhesion and fusion between oocyte and sperm are crucial in the process of fertilization. Many questions about the molecular mechanisms that underlie these processes are still open today. During the last two decades, several proteins have been identified as playing an active role in mediating gametic interaction. However, the only transmembrane protein whose absence is known to cause a total defect of fertilization is the sperm protein Izumo1. Izumo1 belongs to the Izumo protein family, in turn belonging to the Immunoglobulin superfamily. Despite its essential role in mediating gametic fusion, it has not yet been determined whether the protein acts as an adhesion or fusion molecule, or as an organizer of proteins required for fusion or adhesion.

This study has focused on the determination of the role of Izumo1 in the gamete interaction process. We have generated a transgenic construct, allowing the overexpression of Izumo1 on three different cell lines. We have then analyzed the interaction of Izumo1-expressing cells and oocytes with micromanipulation force measurement assays coupled to confocal imaging. We observed a strong adhesion of cells expressing Izumo1 with membrane oocytes and quantified the interaction kinetics. In addition, we generated a recombinant Izumo1 extracellular domain, to investigate whether Izumo1 alone is sufficient to bind to the oocyte. We have probed the interaction of Izumo1 and the oocyte at the single molecule level using the biomembrane force probe technique. These experiments confirmed that Izumo1, and not one of its partners, is responsible for the strong adhesion between Izumo1-expressing cells and oocytes. Finally, we observed that oocyte can interact with multiple Izumo1-GFP-expressing cells at the same time and that Izumo1-GFP accumulated in the contact area. Both observations suggest that the molecular partner of Izumo1 is widely expressed on the oocyte membrane.

Keywords : fecondation ; cell adhesion ; cell fusion ; Izumo1 ; CD9 ; micromanipulation force mesurment